

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE L. PASTEUR

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,
F. MESNIL, G. RAMON,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur.

Secrétaire de la Rédaction : A. BOQUET.

QR
1
A475
V.58
Jan.-June
1937
PER

TOME CINQUANTE-HUITIÈME

Janvier-Juin 1937

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

PARIS. — A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMP., 4, RUE CASSETTE. — 1937.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CINQUANTENAIRE DES ANNALES

Au seuil de l'année 1937, nous tenons à évoquer la mémoire d'Emile Duclaux qui fonda ce périodique en 1887 et le dirigea effectivement jusqu'à sa mort en 1904.

Dans sa célèbre « lettre sur la rage », qui ouvre les *Annales*, Pasteur écrivait à Duclaux : « Le service que vous rendez sera apprécié des jeunes savants, de plus en plus nombreux, qu'attirent les études microbiologiques. Les travaux du laboratoire [nous dirions maintenant : des Instituts Pasteur du monde entier] auront, dans vos *Annales*, une place naturelle, et ceux que vous accueillerez venant d'ailleurs seront pour nous tous un motif d'émulation ».

Grâce aux mémoires que n'ont cessé de leur adresser les savants français et étrangers, les *Annales*, dont cinquante-sept volumes sont parus, ont toujours répondu au but que poursuivaient et leur fondateur et leur illustre Parrain. Notre direction s'efforcera de maintenir, dans le même esprit, leur prospérité scientifique. Elle espère que la période qui commence enregistrera autant d'importantes découvertes que les cinquante années qui viennent de se terminer.

RECHERCHES SUR LES ANTIGÈNES DES VENINS ET LES ANTICORPS DES SÉRUMS ANTIVENIMEUX

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

ACTION D'UN SÉRUM ANTIVENIMEUX BIVALENT (*BITIS ARIETANS* + *SEPEDON HÆMACHATES*) SUR LES DEUX VENINS HOMOLOGUES ET DIVERS VENINS HÉTÉROLOGUES

Par E. CÉSARI et PAUL BOQUET.

Les recherches qui ont fait l'objet de nos publications antérieures (1) avaient porté sur des sérums antivenimeux fournis par des chevaux immunisés avec une seule sorte de venin ; elles nous ont conduits à considérer les venins comme formés par l'assemblage de multiples éléments antigéniques dont certains peuvent se retrouver dans des venins de nature différente.

Cette conception laissait présumer que les sérums préparés à l'aide d'un mélange contenant des venins provenant de diverses espèces de serpents, mélange dans lequel ont chance d'être représentés en plus grand nombre les constituants antigéniques communs à plusieurs de ces poisons, devaient posséder un ensemble d'anticorps leur assurant des valences antivenimeuses s'étendant à la plupart des venins. C'est bien ce que nous a montré l'étude des propriétés d'un sérum antivenimeux mixte, obtenu en associant, dans le traitement immunisant des chevaux, les venins de deux serpents africains, l'un *Bitis arietans* (Vipère heurtante; *Puff ader*) appartenant à la famille des *Vipéridés*, l'autre, *Sepedon hæmachates*

(1) Ces *Annales* : 55, septembre 1933, p. 307; 56, février 1936, p. 171; 56, mai 1936, p. 511.

(Serpent cracheur, *Ringhal*), à la famille des Colubridés. Ce sont ces recherches qui forment le sujet du présent mémoire.

En appliquant les techniques déjà décrites, nous avons mesuré, *in vivo*, le pouvoir antitoxique et, *in vitro*, les effets antidiastasiques exercés par le sérum antivenimeux mixte (*Bitis* + *Sepedon*), à la fois antivipérin et anticobraïque, sur les venins de neuf espèces de serpents, choisies dans les divers groupements de l'ordre des Ophidiens et dont voici l'énumération :

FAMILLE DES VIPÉRIDÉS.

Sous-famille des Vipéridés :

Bitis arietans (Afrique); *Vipera aspis* (Europe); *Cerastes cornutus* (Afrique);
Vipera russeli (Daboïa) [Asie].

Sous-famille des Crotalinés :

Crotalus terrificus (Amérique); *Bothrops atrox* (Amérique).

FAMILLE DES COLUBRIDÉS.

Sepedon haemachates (Afrique); *Naja tripudians* (Asie); *Naja flava* (Cobra du Cap) [Afrique].

Nous conformant au plan suivi dans les mémoires précédents, nous exposerons en premier lieu les recherches ayant trait à la détermination de la toxicité, des pouvoirs coagulant, anticoagulant et hémolytique de ces différents venins, et nous examinerons ensuite les propriétés antitoxique, anticoagulante, anti-anticoagulante, antihémolytique, des sérums antivenimeux mixtes (*Bitis* + *Sepedon*) à l'égard de ces neuf sortes de venins.

1° LES ANTIGÈNES DES VENINS

Nous avons indiqué ailleurs (voir les trois premiers mémoires) la provenance des échantillons étalons des venins de *V. aspis*, *C. cornutus* et *N. tripudians* employés dans nos travaux.

Les échantillons de venins de *B. arietans*, *S. hæmachates* et *N. flava*, dont il va être question, ont été prélevés dans les approvisionnements du Laboratoire de sérothérapie antivenimeuse de l'Institut Pasteur, constitués par des envois effectués au cours de l'année 1935 par M. Filtz-Simons, du Muséum de Port-Elizabeth, et comportant une vingtaine de grammes de venin sec de chaque sorte.

Les venins de *V. russeli*, *C. terrificus* et *B. atrox*, utilisés pour cette étude, ont été obligeamment mis à notre disposition par notre excellent collègue C. Guérin; ils proviennent de la collection de venins rassemblée par notre regretté Maître, le Professeur Calmette.

Mesure de la toxicité *in vivo*.

On ne s'occupera ici que de la toxicité des venins de *B. arietans*, *V. russeli*, *C. terrificus*, *B. atrox*, *S. hæmachates* et *N. flava*. (Nous renvoyons aux trois premiers mémoires pour ce qui regarde les venins de *V. aspis*, *C. cornutus* et *N. tripudians*).

La toxicité de nos échantillons a été déterminée seulement chez le lapin, le venin étant introduit par la voie veineuse. (Les doses indiquées ci-après sont toujours rapportées au kilogramme d'animal).

VENIN DE *Bitis arietans*.

Il faut administrer des doses relativement considérables de ce venin pour arriver à tuer le lapin. Avec 4 milligrammes, la mort survient entre dix et vingt minutes; avec 3 milligrammes, l'animal meurt au bout d'une demi-heure environ; avec 2 milligrammes, en un peu moins d'une heure; en près de trois heures avec 1 milligramme. Au-dessous de cette dose, les sujets présentent des signes d'envenimation, mais ne succombent pas.

Les lapins qui ont reçu une dose rapidement mortelle (3 milligrammes par kilogramme ou plus) demeurent un moment immobiles, dans une attitude inquiète, avant de s'affaïsser; puis, la pupille se resserre, la respiration s'accompagnant souvent de ronchus, devient dyspnéique, des mictions sanglantes se produisent, les pattes postérieures exécutent des mouve-

ments de course désordonnés, des convulsions replient le corps en opisthotonos; enfin, la perte du réflexe cornéen et la mydriase précèdent de peu la mort qui survient par arrêt respiratoire.

A l'ouverture du cadavre, le tissu cellulaire apparaît piqué de taches hémorragiques, les vaisseaux sont gorgés de sang. L'intestin violemment congestionné est parsemé de suffusions sanguines et, en certains points, strié de zébrures purpuriques. Les uretères remplis de sang ont l'apparence de veines turgescents; la vessie est elle-même souvent pleine de sang. Le diaphragme est le siège de nombreuses pétéchies.

Le cœur bat faiblement ou, s'il est arrêté, est encore excitable. Le myocarde est truffé de taches hémorragiques. Les poumons paraissent exsangues. Le sang est liquide; on ne trouve de caillot ni dans les cavités cardiaques, ni dans les vaisseaux abdominaux (1).

VENIN DE *Vipera russeli* (DABOÏA).

Les doses supérieures à 0 milligr. 5 provoquent toujours la mort des lapins en moins de dix minutes. Avec 0 milligr. 3, les animaux périssent en une demi-heure environ. La dose de 0 milligr. 025 ne tue pas.

La symptomatologie de l'envenimation est ici réduite à sa plus simple expression. Le lapin s'effondre brusquement sans signe prodromique et meurt en quelques instants, sans convulsion, sans agonie.

A l'autopsie, on voit le cœur continuer ses battements malgré la présence de caillots dans les cavités droites. Les veines abdominales sont thrombosées. Le foie, la rate et principalement les organes génitaux sont le siège d'une vive congestion.

(1) Le lecteur qui voudra prendre la peine de se reporter au travail publié jadis par l'un de nous, en collaboration avec J. Camus et Jouan (ces *Annales*, 29, avril 1916, p. 181), notera que le tableau anatomo-clinique que nous venons d'esquisser correspond d'une manière frappante à la description donnée à propos du venin de *Crotalus adamanteus*.

VENIN DE *Crotalus terrificus*.

La dose de 0 milligr. 5 représente la limite au delà de laquelle notre échantillon de venin, administré par voie sanguine, tue le lapin en quelques instants; en deçà, il ne détermine que des accidents passagers dont les sujets éprouvés se remettent aisément.

Quelques secondes après l'injection d'une dose mortelle, l'animal effectue des sauts de carpe, tombe sur le flanc, l'œil en myosis, émet un jet d'urine et meurt en l'espace de deux à trois minutes après quelques convulsions.

On constate, à l'autopsie, que le cœur, gorgé de caillots, est arrêté; les poumons sont pâles; le foie est congestionné; la veine porte, la veine cave et les veines rénales sont remplies de sang coagulé. S'il n'y a pas eu de miction pendant les convulsions agoniques, la vessie est distendue par l'accumulation d'urine.

Les lapins qui ont reçu une dose inframortelle présentent de la polypnée, font des efforts de miction, demeurent un certain temps immobiles, somnolents, puis tout rentre dans l'ordre.

VENIN DE *Bothrops atrox*.

L'échantillon dont nous nous sommes servis tue le lapin, dans la veine, à partir de la dose de 0 milligr. 01; au-dessous, il se montre inoffensif.

Les doses égales ou supérieures à 0 milligr. 03 amènent toujours la mort en moins de cinq minutes. A peine a-t-on poussé l'injection que l'animal replie la tête sur le cou, s'écroule sur le sol, les yeux exorbités, en mydriase, et succombe après quelques mouvements convulsifs.

Avec 0 milligr. 01, le lapin ne manifeste tout d'abord qu'un peu d'excitation, puis brusquement, au bout d'un quart d'heure, il culbute en piquant du nez et meurt en quelques instants.

A l'autopsie, le cœur bat encore faiblement quoique ses cavités soient remplies de caillots; les poumons paraissent exsangues; le foie est fortement congestionné et l'intestin souvent hypérémié. Le sang contenu dans les veines cave et porte est coagulé.

VENIN DE *Sepedon hæmachates*.

Les doses dépassant 1 milligramme font périr le lapin en moins d'une demi-heure; celles comprises entre 1 milligramme et 0 milligr. 6 le tuent en une, deux ou trois heures. Entre 0 milligr. 5 et 0 milligr. 3 la mort est inconstante. Au-dessous de 0 milligr. 3 la plupart des animaux survivent.

Contrairement à ce que nous avons constaté avec tous les autres venins maniés au cours de nos recherches, on observe des différences individuelles assez notables dans la sensibilité des lapins aux effets du venin de *Sepedon hæmachates*; ainsi, de trois lapins ayant reçu la dose de 0 milligr. 5, l'un est mort en cinquante-quatre minutes, un autre en trois heures, le dernier a survécu. Avec 0 milligr. 4, on a tué un lapin sur deux (mort en deux heures).

L'administration d'une dose de venin capable d'amener la mort en moins d'une heure provoque immédiatement de la polypnée, le lapin demeure d'abord immobile, somnolent, puis apparaissent des signes de paralysie du train antérieur, la tête est tombante, le menton reposant sur le sol; la respiration devient dyspnéique, enfin l'animal, alors complètement affaissé, présente de l'exorbitisme avec mydriase et succombe par arrêt respiratoire, le corps secoué par des convulsions agoniques.

A l'autopsie, le cœur bat faiblement, les poumons sont pâles, le foie et la rate légèrement congestionnés. On trouve un peu de liquide clair épanché dans la cavité péritonéale.

VENIN DE *Naja flava*.

Avec 1 milligramme, on tue le lapin en une demi-heure; avec 0 milligr. 25, en deux à trois heures; avec 0 milligr. 15 en une dizaine d'heure. La dose de 0 milligr. 1 n'est pas mortelle.

Après une période d'incubation dont la durée est d'autant plus courte que la dose est plus forte, le lapin qui a reçu le venin de Cobra du Cap dans la veine tombe dans un assoupissement profond. De temps à autre, il est tiré de sa somnolence par de courts réveils que traduit un brusque relèvement de la tête. Finalement, l'animal étendu sur le côté, le corps mou, agité de

soubresauts convulsifs, la nyctitante recouvrant partiellement le globe oculaire en mydriase, perd insensiblement la vie par ralentissement respiratoire.

L'ouverture du cadavre ne révèle aucune lésion caractéristique : le cœur bat faiblement, les poumons paraissent anémiés, le foie et l'intestin sont congestionnés; le sang est liquide et coagule avec retard.

Nous rassemblons ci-dessous, les chiffres donnant la mesure de la toxicité relative des différentes sortes de venins envisagés dans ce travail, d'après la dose minima mortelle pour le lapin éprouvé par la voie veineuse.

	UNITÉ venimeuse gramme lapin- veine en milligramme	NOMBRE D'UNITÉS venimeuses contenues dans 1 milligr. de venin
<i>Bitis arietans</i>	0,001	1.000
<i>Vipera aspis</i>	0,00035	2.850
<i>Cerastes cornutus</i>	0,0005	2.000
<i>Vipera russeli</i>	0,0003	3.330
<i>Crotalus terrificus</i>	0,00055	1.800
<i>Bothrops atrox</i>	0,00001	100.000
<i>Sepedon hæmachates</i>	0,0005	2.000
<i>Naja tripudians</i>	0,0002	5.000
<i>Naja flava</i>	0,00015	6.660

Mesure du pouvoir coagulant *in vitro*.

Comme le venin de *N. tripudians*, les venins de *B. arietans*, *S. hæmachates*, *N. flava*, se sont montrés démunis de pouvoir coagulant, à l'égard du plasma de Cheval, dans les conditions expérimentales mises en jeu dans notre technique. La mesure du pouvoir coagulant des venins de *V. aspis*, *C. cornutus*, *V. russeli*, *C. terrificus*, *B. atrox* est donnée par les chiffres inscrits dans le tableau I.

Mesure du pouvoir anticoagulant.

Comme le venin de *Naja tripudians*, les venins de *B. arietans*, *S. hæmachates*, *N. flava* jouissent à l'égard du plasma de Cheval, de propriétés anticoagulantes qui, dans les conditions

TABLEAU I.

NUMÉROS des tubes	DOSES DE VENIN en milligrammes	<i>Vipera</i> <i>aspis</i>		<i>Cerastes</i> <i>cornutus</i>		<i>Vipera</i> <i>russeli</i>		<i>Crotalus</i> <i>terrificus</i>		<i>Bothrops</i> <i>atrox</i>	
		1/2 heure	1 heure	1/2 heure	1 heure	1/2 heure	1 heure	1/2 heure	1 heure	1/2 heure	1 heure
1	0,000.005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,000.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	c
3	0,000.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C
4	0,000.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C
5	0,000.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C
6	0,000.25	0	0	0	c	0	0	0	0	c	C
7	0,000.5	0	0	c	C	0	0	0	0	c	C
8	0,001	C	C	C	C	0	0	0	0	C	C
9	0,0025	C	C	C	C	0	c	0	0	C	C
10	0,005	C	C	C	C	0	c	0	0	C	C
11	0,01	C	C	C	C	C	C	0	0	C	C
12	0,025	C	C	C	C	C	C	c	c	C	C
13	0,05	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
14	0,1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
15	0,25	c	c	C	C	C	C	C	C	C	C
16	0,50	0	0	C	C	C	C	C	C	C	C
17	1	0	0	C	C	C	C	C	C	C	C
18	2,5	0	0	C	C	C	C	C	C	C	C
Témoin . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C, coagulation massive; c, coagulation partielle; 0, absence de coagulation.

TABLEAU II.

NUMÉROS des tubes	DOSES de venin en milligrammes	<i>Bitis</i> <i>arietans</i>	<i>Naja</i> <i>tripudians</i>	<i>Sepedon</i> <i>hæmachates</i>	<i>Naja</i> <i>flava</i>
1	0,000.05	C	C	C	C
2	0,000.1	C	C	C	C
3	0,000.25	C	C	C	C
4	0,000.5	C	C	C	C
5	0,001	C	C	C	C
6	0,0025	0	C	0	C
7	0,005	0	C	0	0
8	0,01	0	c	0	0
9	0,025	0	0	0	0
10	0,05	0	0	0	0
11	0,1	0	0	0	0
12	0,25	0	0	0	0
13	0,5	0	0	0	0
14	1	0	0	0	0
15	2,5	0	0	0	0
Témoin . . .	0	C	C	C	C

C, coagulation totale; c, coagulation partielle; 0, absence de coagulation.

de notre technique (voir troisième mémoire, p. 517), se manifestent selon les indications portées dans le tableau II.

Mesure de l'action hémolytique.

Nous rassemblons dans le tableau III les chiffres donnant la mesure du pouvoir hémolytique de nos différents échantillons de venins, jugé d'après les effets de la lysocithine engendrée à la température de 37°, au contact du sérum de Cheval et agissant à 0° sur les globules rouges de Cheval.

TABLEAU III.

NUMÉRO des tubes	DOSES DE VENIN en milligrammes	RÉSULTATS APRÈS 30 MINUTES A 0°								
		<i>Bilis arietans</i>	<i>Vipera aspis</i>	<i>Ceraastes cornutus</i>	<i>Vipera russelli</i>	<i>Crotalus terrificus</i>	<i>Boihrops atrox</i>	<i>Sepedon hæmachates</i>	<i>Naja tripudians</i>	<i>Naja flava</i>
1.	5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
2.	3,5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
3.	1,5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
4.	0,5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
5.	0,35	H	H	H	H	H	H	H	H	H
6.	0,15	0	H	H	H	H	H	H	H	H
7.	0,05	0	H	H	H	H	H	H	H	H
8.	0,035	0	H	H	H	H	H	H	H	h
9.	0,015	0	H	H	H	H	H	H	H	0
10.	0,005	0	H	H	H	H	h	H	H	0
11.	0,0035	0	H	H	h	h	0	H	H	0
12.	0,0015	0	H	H	0	0	0	H	H	0
13.	0,0005	0	H	H	0	0	0	0	H	0
14.	0,00035	0	h	H	0	0	0	0	H	0
15.	0,00015	0	0	h	0	0	0	0	H	0
Témoin. . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

H, hémolyse totale; h, hémolyse partielle; 0, absence d'hémolyse.

2° LES ANTICORPS DES SÉRUMS ANTIVENIMEUX MIXTES (*B. ARIETANS* + *S. HÆMACHATES*)

Les sérums antivenimeux utilisés dans nos expériences de titrage provenaient de deux chevaux (n° 905 et n° 917), qui, depuis plus d'une année, subissaient tous les quinze jours, à

doses croissantes, des injections sous-cutanées d'un mélange de venins de *Bitis arietans* et de *Sepedon hæmachates*. A la date où fut effectuée la saignée ayant fourni les sérums qui ont servi aux épreuves, ces chevaux avaient respectivement reçu, en tout, le cheval n° 905 : 12 gr. 107 de venin de *B. arietans* et 8 gr. 069 de venin de *S. hæmachates*; le cheval n° 917 : 8 gr. 452 de venin de *B. arietans* et 7 gr. 422 de venin de *S. hæmachates*.

Détermination du pouvoir antitoxique.

Pour évaluer la puissance antitoxique de ces deux sérums antivenimeux mixtes vis-à-vis des deux venins homologues et des sept venins hétérologues, nous avons déterminé la plus faible quantité de sérum capable de neutraliser par mélange, au bout d'une demi-heure de contact à la température de l'étuve, au moins deux doses mortelles du venin considéré, en choisissant pour les raisons exposées dans le précédent mémoire, le lapin comme sujet d'épreuve et la voie veineuse pour l'administration.

1° ACTION SUR LE VENIN DE *Bitis arietans*.

Le sérum 905 neutralise 1 milligramme de venin de *B. arietans*, soit 1.000 unités venimeuses, à la dose de 0 c. c. 4 dans un mélange contenant cinq fois la dose minima mortelle de venin (5 milligrammes par kilogramme). Si la proportion de sérum dans le mélange tombe à 0 c. c. 3 par milligramme de venin, le lapin succombe en dix à quinze heures, sans présenter les lésions hémorragiques caractéristiques.

Le sérum 917, dans les mêmes conditions, n'arrive à neutraliser 1 milligramme de venin qu'à la dose de 0 c. c. 9. Lorsqu'on emploie ce sérum au taux de 0 c. c. 8 par milligramme de venin, le lapin meurt en quatre heures environ avec les lésions purpuriques habituelles.

2° ACTION SUR LE VENIN DE *Sepedon hæmachates*.

Le sérum 905 neutralise 1 milligramme de venin de *S. hæmachates*, soit 2.000 unités antivenimeuses, dans un

mélange contenant quatre fois la dose minima mortelle de ce venin (2 milligrammes par kilogramme), à la dose de 2 c. c. 8. Avec 2 c. c. 6 par milligramme de venin, le lapin périt en une heure environ.

Le sérum 917 neutralise, dans les mêmes conditions, 1 milligramme de venin à la dose de 2 cent. cubes. Si la proportion de sérum par milligramme de venin n'est que de 1 c. c. 8, le mélange tue le lapin en deux heures environ.

3° ACTION SUR LE VENIN DE *Vipera aspis*.

Le sérum 905 neutralise 1 milligramme de venin de Vipère commune, soit 2.850 unités venimeuses, à la dose de 3 cent. cubes dans un mélange contenant quatre doses mortelles (1 milligr. 40 par kilogramme). Si la proportion de sérum tombe à 2 cent. cubes par milligramme de venin, la mort du lapin éprouvé survient au bout d'une demi-heure; on ne trouve de caillot que dans la veine porte, mais l'intestin est couvert de pétéchies.

Le sérum 917 se montre capable de neutraliser 1 milligramme de ce venin à la dose de 9 cent. cubes lorsque le mélange comporte l'emploi de deux doses mortelles (0 milligr. 70 par kilogramme). Lorsqu'on descend à 8 cent. cubes de sérum par milligramme de venin, le lapin succombe en quelques minutes par coagulation massive du sang.

4° ACTION SUR LE VENIN DE *Cerastes cornutus*.

Le sérum 905 neutralise 1 milligramme de venin de la Céraste à corne (2 000 unités venimeuses) à la dose de 1 c. c. 6 dans un mélange représentant quatre fois la dose mortelle, soit 2 milligrammes par kilogramme. Avec 1 c. c. 4 de sérum, le lapin meurt en quelques minutes avec les lésions coutumières.

Le sérum 917 n'assure la neutralisation de ce venin, dans un mélange contenant seulement deux doses mortelles (1 milligramme par kilogramme), qu'à partir de 7 cent. cubes par milligramme. Quand la proportion de sérum est de 6 cent. cubes par milligramme, l'animal éprouvé ne survit qu'une heure et demie; on ne relève alors aucune trace de coagulation sanguine à l'autopsie.

5° ACTION SUR LE VENIN DE *Vipera russeli*.

Le sérum 905 peut neutraliser 1 milligramme de venin de Daboïa (soit 3.330 unités venimeuses) à partir de 2 cent. cubes lorsque le mélange contient un peu plus de trois doses mortelles (soit 1 milligramme par kilogramme). Si la proportion de sérum n'est que de 1 c. c. 9 par milligramme de venin, la mort du lapin survient en moins de dix minutes.

Le sérum 917 ne se montre antitoxique vis-à-vis de ce venin, qu'à la dose de 10 cent. cubes par milligramme, en utilisant un peu moins de deux doses mortelles (0 milligr. 5 par kilogramme). Dans les mêmes conditions, 9 cent. cubes sont sans effet.

6° ACTION SUR LE VENIN DE *Crotalus terrificus*.

Le sérum 905 arrive à neutraliser complètement 1 milligramme de venin (soit 1.800 unités venimeuses) à la dose de 7 cent. cubes dans un mélange ne contenant que deux doses mortelles (1 milligr. 10 par kilogramme). Avec 5 ou 4 cent. cubes par milligramme, la mort du lapin se produit tardivement, entre douze et trente-six heures, sans coagulation du sang.

Le sérum 917, dans des conditions semblables, ne manifeste de pouvoir antitoxique qu'au-dessus de 8 cent. cubes par milligramme, mais des doses de 7 cent. cubes, 5 cent. cubes, 4 cent. cubes suffisent pour empêcher la mort brutale, par coagulation du sang, des lapins éprouvés.

7° ACTION SUR LE VENIN DE *Bothrops atrox*.

Les sérums 905 et 917 ne possèdent aucune propriété antitoxique appréciable vis-à-vis du venin de *Bothrops*. Contre deux doses mortelles de ce venin (0 milligr. 02 par kilogramme), des volumes de sérum calculés sur la base de 200 à 250 cent. cubes par milligramme de venin demeurent sans action, les lapins éprouvés succombent toujours en moins de dix minutes avec des thromboses généralisées.

Nous avons résumé l'ensemble de ces résultats dans le tableau précédent où se trouvent indiqués, exprimés en unités antivenimeuses (gramme Lapin veine), les titres respectifs des deux sérums antivenimeux mixtes (*B. arietans* + *S. hæmachates*) vis-à-vis des différentes sortes de venins envers lesquels ils ont été expérimentés.

Remarques générales.

Au cours du traitement immunisant auxquels furent soumis les chevaux dont les sérums ont été utilisés pour effectuer les essais rapportés ci-dessus, les mélanges des deux venins injectés aux animaux ont toujours comporté pondéralement plus de venin de *Bilis arietans* que de venin de *Sepedon hæmachates*, la proportion de celui-ci par rapport à celui-là étant de 0,66 p. 100 pour le cheval n° 905, de 0,86 p. 100 pour le cheval n° 917. Il n'est donc pas surprenant de constater que les sérums des chevaux 905 et 917 se montrent l'un et l'autre relativement plus actifs à l'égard du venin de *B. arietans* qu'à l'égard du venin de *S. hæmachates*. On notera cependant que le sérum 905 environ deux fois plus antitoxique que le sérum 917 vis-à-vis du venin de *B. arietans*, est moins actif que ce dernier vis-à-vis du venin de *S. hæmachates*.

En plus de leur action antivenimeuse contre les deux venins homologues, les deux sérums 905 et 917 possèdent des propriétés neutralisantes plus ou moins marquées envers la plupart des venins hétérologues contre lesquels ils ont été essayés. Il est intéressant de relever, à ce propos, que le sérum 905, le plus actif des deux vis-à-vis du venin de *B. arietans*, est également doué d'un pouvoir antitoxique plus fort que celui du sérum 917 vis-à-vis des autres venins de Vipéridés. Par contre, le sérum 917, le plus actif des deux à l'égard du venin de *S. hæmachates* est plus antitoxique ou aussi antitoxique que le sérum 905, à l'égard des autres venins de Colubridés.

Notons en passant que, pour les deux sérums, le titre antivenimeux correspondant au venin de *Naja flava* hétérologue, est relativement plus élevé que celui qui correspond au venin de Colubridé homologue, *Sepedon hæmachates*.

Quant aux effets sur les venins de *Crotalinés*, il est à souligner que nos deux sérums antivenimeux mixtes se sont montrés complètement inactifs envers le venin de *Bothrops atrox* et doués envers le venin de *Crotalus terrificus* d'une faible activité marquée avant tout par l'entrave apportée à la manifestation de son pouvoir coagulant *in vivo*.

Détermination du pouvoir anticoagulant.

Il a été dit plus haut que nos échantillons de venins de *B. arietans* et de *S. hæmachates* étaient dépourvus de pouvoir coagulant; il ne paraissait donc pas indiqué, dans ces conditions, de rechercher si les sérums antivenimeux obtenus en partant de ces deux venins étaient capables d'empêcher les effets des venins coagulants. Nous avons eu nonobstant la curiosité de voir si cette déduction *a priori* se trouverait justifiée par l'expérience. On s'apercevra à la lecture du tableau ci-dessous que les deux sérums antivenimeux mixtes se sont montrés

TABLEAU V.

NUMÉROS des tubes	DOSES DE SÉRUM ANTI mises en contact avec V gouttes de venin au 1/10.000 avant l'addition du plasma en centimètre cube	LECTURE APRÈS 30 MINUTES de séjour à l'étuve									
		Sérum n° 905					Sérum n° 917				
		<i>Vipera aspis</i>	<i>Cerastes cornutus</i>	<i>Vipera russeli</i>	<i>Crotalus terrificus</i>	<i>Bothrops atrox</i>	<i>Vipera aspis</i>	<i>Cerastes cornutus</i>	<i>Vipera russeli</i>	<i>Crotalus terrificus</i>	<i>Bothrops atrox</i>
1.	0,3	0	0	0	c	C	c	0	0	c	C
2.	0,25	0	0	0	c	C	C	0	c	c	C
3.	0,1	C	0	0	c	C	C	0	c	c	C
4.	0,07	C	0	0	c	C	C	C	C	c	C
5.	0,03	C	C	0	C	C	C	C	C	C	C
6.	0,01	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
7.	0,007	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
8.	0,003	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
9.	0,001	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
10.	0,0007	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
11.	0,0003	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Témoin 1, X gouttes de sérum normal + V gouttes de venin au 1/10.000 = C; Témoin 2, X gouttes de sérum normal + V gouttes d'eau physiologique = 0; C, coagulation massive; c, coagulation partielle; 0, absence de coagulation.

paradoxalement munis d'un pouvoir anticoagulant, peu intense il est vrai mais suffisamment net, surtout pour ce qui concerne le sérum 905, s'exerçant vis-à-vis des trois venins de Vipéridés (*V. aspis*, *C. cornutus*, *V. russeli*). A peine esquissée vis-à-vis du venin de *Crotalus terrificus*, cette action anticoagulante ne s'est pas manifestée vis-à-vis du venin de *Bothrops atrox*.

Nous ferons observer que si le pouvoir anticoagulant des deux sérums paraît qualitativement marcher de pair avec le pouvoir antitoxique, la concordance ne se vérifie pas complètement dans l'ordre quantitatif.

Détermination du pouvoir anti-anticoagulant.

L'action antagoniste des sérums sur les propriétés anticoagulantes des venins a été recherchée par la méthode décrite dans le troisième mémoire (p. 528). Nous avons déterminé le

TABLEAU VI.

NUMÉROS des tubes	DOSES DE SÉRUM ANTI mises en contact avec le venin avant l'addition du plasma en centimètre cube	SÉRUM 905				SÉRUM 917			
		<i>Bitis arietans</i>	<i>Sepedon hemnaches</i>	<i>Naja flava</i>	<i>Naja tripudians</i>	<i>Bitis arietans</i>	<i>Sepedon hemnaches</i>	<i>Naja flava</i>	<i>Naja tripudians</i>
1.	0,05	C	C	C	C	0	C	C	C
2.	0,25	C	C	C	C	0	C	C	C
3.	0,1	0	0	C	0	0	0	c	0
4.	0,07	0	0	C	0	0	0	c	0
5.	0,03	0	0	c	0	0	0	0	0
6.	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
7.	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0
8.	0,003	0	0	0	0	0	0	0	0
9.	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	0,0007	0	0	0	0	0	0	0	0
11.	0,0003	0	0	0	0	0	0	0	0

Doses de venin utilisées : *Bitis*, V gouttes au 1/500; *Sepedon*, V gouttes au 1/10.000; *Naja flava*, II gouttes au 1/1.000 + III gouttes eau physiologique; *Cobra*, V gouttes au 1/50.000.

Témoin 1, X gouttes de sérum normal + 1 dose anticoagulante des venins : *Bitis* = 0; *Sepedon* = 0; *Naja flava* = 0; *Cobra* = 0.

Témoin 2, X gouttes de sérum normal + V gouttes d'eau physiologique = C après trente minutes.

Lecture après une heure : C, coagulation totale; c, coagulation partielle; 0, absence de coagulation.

pouvoir empêchant des sérums 903 et 917 vis-à-vis des venins suivants : *B. arietans*, *S. hæmachates*, *N. tripudians* et *N. flava*. Les résultats des expériences sont rassemblés dans le tableau VI.

On voit que les effets anticoagulants des venins sont plus ou moins entravés par les sérums antivenimeux mixtes (*B. arietans* + *S. hæmachates*), le venin de *N. flava* étant plus sensible à leur action que les deux venins homologues et le sérum 917 se montrant inactif à l'égard du venin de *B. arietans*. Ici encore, on ne relève pas de parité étroite entre le pouvoir anti-anticoagulant des sérums et leur valeur antitoxique.

Détermination du pouvoir anti-hémolytique.

Les deux venins, *B. arietans* et *S. hæmachates*, possédant tous les deux, ainsi qu'on l'a vu plus haut, la faculté d'engendrer une lysocithine hémolytique, les sérums antivenimeux mixtes qu'ils ont servi à obtenir devaient jouir d'une fonction contra-riante. C'est bien ce que montre le tableau VII, ci-dessous, qui donne la mesure du pouvoir antihémolytique des deux sérums 903 et 917 vis-à-vis des neuf sortes de venins utilisés dans nos expériences.

Très actifs à l'égard de la lysocithine des venins de *Naja flava* et de *Sepedon hæmachates*, assez actifs vis-à-vis de celle des venins de *Cerastes cornutus* et *Vipera aspis*, les sérums antivenimeux mixtes (*B. arietans* + *S. hæmachates*) n'ont qu'une faible influence sur le pouvoir hémolytique des venins de *Naja tripudians*, de *Bitis arietans*, de *Crotalus terrificus* et de *Bothrops atrox*, le sérum 917 paraissant même complètement inactif à l'égard des deux venins de Crotalinés.

Plus encore que précédemment, s'avère ici l'absence de parallélisme entre la puissance antitoxique des sérums antivenimeux et leur pouvoir antihémolytique.

*
* *

Les expériences dont nous venons de rendre compte, confirmant les conclusions émises à la suite de nos premiers travaux au sujet du manque de coordination entre les propriétés anti-

TABEAU VII.

NUMÉROS des tubes	DOSES de sérum anti mises en contact avec le venin pendant 30 minutes à 37° avant l'addition des globules rouges en centimètre cube	LECTURE APRÈS 30 MINUTES A 0°																	
		Sérum 905									Sérum 917								
1.	0,5	Vipera aspis	Cerastes cornutus	Bilis arletians	Crotalus terrificus	Bothrops atrox	Vipera russelli	Sepdon hamachates	Naja flava	Naja tripudians	Vipera aspis	Cerastes cornutus	Bilis arletians	Crotalus terrificus	Bothrops atrox	Vipera russelli	Sepdon hamachates	Naja flava	Naja tripudians
2.	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6.	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.	0,003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoin (4).	0,5	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Doses de venin utilisées : *Vipera aspis*, V gouttes au 1/100.000; *Cerastes cornutus*, V gouttes au 1/100.000; *Bilis arletians*, V gouttes au 1/500; *Crotalus terrificus*, V gouttes au 1/10.000; *Bothrops atrox*, V gouttes au 1/10.000; *Vipera russelli*, V gouttes au 1/50.000; *Sepdon hamachates*, V gouttes au 1/100.000; *Naja flava*, V gouttes au 1/5.000; *Naja tripudians*, V gouttes au 1/10.000.

Témoin (2) : 10 c. c. 5 sérum 905 + V gouttes eau physiologique = 0; 2e 0 c. c. 5 sérum 917 + V gouttes eau physiologique = 0; 3e 0 c. c. 5 sérum normal + V gouttes eau physiologique = 0.

H, hémolyse totale; h, hémolyse partielle; 0, absence d'hémolyse.

toxiques et antidiastatiques des sérums antivenimeux, condamnent définitivement les méthodes de titrage de ces sérums basées sur la détermination de leur action sur la coagulation du plasma ou l'hémolyse des globules rouges par les venins.

Elles montrent que les constituants antigéniques de la plupart des venins sont liés par des parentés sérologiques rapprochant physiologiquement des espèces de serpents très éloignées les unes des autres par leur classification zoologique et leur habitat géographique. (Dans cet ordre d'idées, il ressort de nos recherches que les Crotalinés paraissent former, par les caractères antigéniques particuliers de leurs sécrétions venimeuses, un groupement aussi distant des Vipéridés que des Colubridés.)

Elles incitent à poursuivre l'analyse sérologique des différents venins dans le but de réaliser par le choix et l'association rationnelle de ceux qui offrent les facultés antipoiétiques les mieux adaptées, des complexes antigéniques susceptibles d'engendrer des ensembles d'anticorps rendant les sérums antivenimeux valables pour le traitement des morsures de tous les serpents dangereux appartenant à la faune erpétologique de territoires déterminés, voire d'un continent.

Elles font enfin ressortir d'une façon saisissante les différences individuelles qu'offrent les chevaux dans leur aptitude à fournir des anticorps répondant aux antigènes venimeux qui leur sont administrés.

Les résultats des expériences portant sur les sérums antivenimeux monovalents, antivipérins ou anticobraïques, qui ont fait l'objet des trois premiers mémoires, avaient déjà révélé des écarts considérables dans le pouvoir antitoxique des divers sérums soumis aux titrages, écarts qui ne correspondaient rigoureusement ni à la quantité de venin utilisée dans les injections ayant précédé la prise de sang, ni à la somme globale de venin employée depuis le début du traitement. De ce côté, rien de surprenant, les mêmes constatations étant de notion courante aussi bien dans la préparation des sérums antimicrobiens que dans la préparation des sérums antitoxiques. Mais ce qu'il y a de particulièrement frappant dans les expériences effectuées avec les sérums antivenimeux mixtes (*B. arietans* + *S. hæmachates*), c'est que des deux sérums examinés, l'un s'est montré relativement plus actif envers les venins de Vipé-

ridés qu'envers les venins de Colubridés, tandis que l'autre se révélait relativement plus actif à l'égard des venins de Colubridés qu'à l'égard des venins de Vipéridés, sans que les degrés de leur activité vis-à-vis des différents venins, dans chaque catégorie, fussent pareillement ordonnés.

Ces observations sont à rapprocher de celles que l'un de nous, eut l'occasion de faire jadis, avec son maître Maurice Nicolle, au cours d'une étude sur les propriétés des sérums de Lapins et de Cobayes traités par des globules rouges, des cellules organiques ou des sérums de diverses espèces animales(1), et qui avaient fait dire à Maurice Nicolle que : *L'histoire des anticorps artificiels appartient à l'histoire des phénomènes de résonnance, envisagés dans leur aspect le plus général.*

(1) M. NICOLLE et E. CÉSARI, Etudes sur la toxicité et l'hémotoxicité des sérums normaux et des antisérums. *Journ. de Phys. et de Path. gén.*, t. 16, n° 4, juillet 1914 et n° 5, septembre 1915.

SUR UNE NOUVELLE RÉACTION COLORÉE DU CUIVRE ET DE L'UROBILINE

Par GABRIEL BERTRAND et LOUIS DE SAINT-RAT.

La chimie analytique possède un grand nombre de réactifs permettant de reconnaître la présence d'un sel de cuivre dissous dans l'eau, même à une grande dilution. C'est ainsi que le ferrocyanure de potassium, qui engendre un précipité rouge brun dans les solutions de concentrations moyennes, donne encore une coloration rougeâtre avec 1 centimètre cube d'une solution de cuivre au 1/200.000 (à 5 milligrammes par litre), donc avec 1/200 de milligramme de métal. Le réactif de Bach à la formaldoxime (1) est encore plus sensible, car il permet d'atteindre la dilution du millionième. Ces réactifs exigent la séparation préalable du cuivre et de la plupart des autres métaux avec lesquels ils fournissent aussi des réactions colorées.

Nous avons découvert et étudié un réactif supérieur aux précédents à la fois par sa spécificité, sa sensibilité et la facilité de son emploi : c'est l'urobiline en solution au millième dans l'alcool à 60°. Lorsqu'on ajoute quelques gouttes du nouveau réactif à une solution même très diluée de sel cuivrique, il se développe presque immédiatement une coloration allant du rose au pourpre, selon la teneur en cuivre. La coloration est rose autour de la teneur du millionième et déjà purpurine à la teneur du cent-millième.

Cette réaction, particulièrement sensible en milieu neutre, diminue progressivement d'intensité quand la concentration en ions hydrogène augmente. Lorsque le liquide dans lequel on veut rechercher une trace de cuivre est acide, comme cela se rencontre souvent dans la pratique des analyses, il convient de le neutraliser à peu près et d'y ajouter, si l'acidité restante est due à un acide minéral, un peu d'acétate de sodium.

(1) BACH, *C. R. Ac. Sc.*, 428, 1899, p. 363 ; et DENIGÈS, *C. R. Ac. Sc.*, 194, 1932, p. 895.

La présence de l'alcool diminue l'influence des ions hydrogène et rend la réaction plus sensible. D'après nos essais, une proportion de 50 à 60 p. 100 d'alcool dans le mélange permet d'atteindre le maximum de sensibilité.

Nous avons essayé l'action de l'urobiline (1) dans la proportion de X à XX gouttes pour 10 cent. cubes de solution renfermant 0 milligr. 1 de métal, avec les sulfates ou chlorures d'aluminium, de baryum, de calcium, de cadmium, de cobalt, d'étain (stanneux), de fer (ferreux), de glucinium, de lithium, de magnésium, de manganèse, de nickel, d'or, de platine, de strontium et de zinc ; avec le nitrate d'argent, l'arsénite et l'arséniate de sodium, l'émétique, l'alun de chrome et le chromate de potassium, l'alun ferrico-ammoniacal, le molybdate et le tungstate de sodium, enfin le vanadate d'ammoniac. Nous n'avons observé de coloration qu'avec le sel de cuivre. Dans la solution de sel de zinc, il est apparu, comme cela a été signalé depuis longtemps (2), une fluorescence verte, sans coloration du liquide. La réaction donnée par l'urobiline est donc très caractéristique de la présence du cuivre.

Lorsqu'on ajoute du ferrocyanure de potassium à une solution de sel de cuivre, il se produit, comme nous l'avons rappelé, un ferrocyanure rouge ; avec une solution de sel de zinc, il se fait du ferrocyanure blanc de zinc. Mais lorsqu'on verse le même réactif dans une solution contenant à la fois du cuivre et du zinc, les deux métaux étant dans la proportion, par exemple, d'une partie du premier pour 4 à 5 p. 100 du second, le produit de la réaction n'est ni rouge, ni blanc, il est, comme l'ont reconnu Maquenne et Demoussy (3), de couleur bleue, et l'on peut se croire en présence d'une solution ferrique.

Nous avons cherché si une interférence de cette sorte se produisait avec l'urobiline, dans le cas, du moins, des métaux qui accompagnent le plus habituellement le cuivre. Nous avons

(1) La substance dont nous nous sommes servis a été extraite, avec un rendement d'environ 1 gramme par kilogramme, de la matière fécale humaine. D'abord étudiée sous le nom de stercobiline, elle a, depuis, été reconnue identique à l'urobiline par C. J. Watson. *J. Physiol. Chem.*, **233**, 1935, p. 39.

(2) M. JAFFE. *Virchows Archiv f. pathol. Anatom.*, **47**, 1869, p. 405.

(3) MAQUENNE et DEMOUSSY. *C. R. Ac. Sc.*, **168**, 1919, p. 489, et *Bull. Soc. chim.*, **4^e s.**, **25**, 1919, p. 272. La réaction se produit en milieu acide.

fait agir le réactif organique sur des solutions contenant, dans 1 cent. cube d'acétate de sodium décinormal, 1/100 de milligramme de cuivre et 1/10 de milligramme des métaux suivants : aluminium, baryum, calcium, cadmium, cobalt, fer ferreux, fer ferrique, magnésium, manganèse, nickel, strontium et zinc. Il n'y a eu de changement de coloration que dans le cas du fer présent à l'état ferreux. Bien que, chose curieuse, le sel ferreux seul ne se colore pas par l'urobiline, il intensifie, en la faisant virer au violet pourpre, la coloration du cuivre. Quant au zinc, il perd plus ou moins sa fluorescence, mais il n'altère pas la réaction colorée.

La nouvelle réaction n'est pas seulement très spécifique, elle est en même temps très sensible. Une série de mélanges a été préparée dans de petits tubes à essais, de 10 millimètres de diamètre, contenant chacun 0 c. c. 9 d'une solution d'acétate de sodium décinormale dans l'alcool à 60° (13 grammes de sel cristallisé par litre) et 0 c. c. 1 d'une solution titrée de sulfate de cuivre; on a ajouté goutte à goutte à ces mélanges de la solution d'urobiline au millième dans l'alcool à 60° jusqu'à ce que la coloration rose n'augmente plus et qu'il y ait même, dans certains d'entre eux, un léger excès de ce réactif. La série de tubes comprenait ainsi :

NUMÉROS des tubes	QUANTITÉS	
	de cuivre en milligramme	de réactif en gouttes
1.	0,01	IV
2.	0,001	II
3.	0,0005	II
4.	0,0004	II
5.	0,0003	I
6.	0,0002	I
7.	0,0001	I
8 (tube témoin).	0,0000	I

Voici ce que l'on a observé lorsqu'on a ajouté l'urobiline : la coloration rose est apparue d'autant plus lentement que la dilution en cuivre était plus grande, immédiate ou presque immédiate dans les tubes 1 et 2, en un laps croissant de quelques secondes à quelques dizaines de secondes dans les tubes où la dose de métal diminuait de 0 milligr. 0005 à 0 milligr. 0001. Dans les tubes 3 et 4, la coloration rose s'est

développée nette et pure dès la première goutte de réactif, elle a augmenté avec la seconde, mais en passant alors au rose orangé à cause d'un excès d'urobiline. Dans le tube 5, la réaction ayant été encore un peu moins rapide que dans les précédents, le liquide est resté jaune quelques secondes puis une teinte rose très nette a remplacé peu à peu et complètement celle de l'urobiline. Dans le tube 6, la réaction n'a pas consommé la totalité de l'urobiline et le liquide est devenu rose orangé. Enfin, dans le tube 7, la coloration s'est encore développée d'une façon assez manifeste pour être perçue directement, malgré l'excès de réactif; par comparaison avec le tube témoin, la différence était frappante. Un nouveau tube de même composition que le tube 7, avec 0 milligr. 0001 de cuivre, mais auquel on n'a ajouté que la valeur d'une demi-goutte d'urobiline, a fourni une réaction rose presque pure et facilement reconnaissable au premier examen.

Les colorations dues à l'action de l'urobiline sur les sels de cuivre peuvent être conservées quelques jours et il est possible, en tenant compte des observations que nous avons rapportées, de les utiliser pour le dosage colorimétrique de très petites quantités de métal.

Si l'on considère, enfin, la réaction par rapport à l'urobiline, on constate que l'intensité de la coloration obtenue n'est pas plus grande que celle de la substance organique. Le virage du jauné au pourpre peut donc servir, dans certains cas, comme réaction d'identification.

En résumé, l'urobiline permet de déceler et même de doser colorimétriquement de très petites quantités de cuivre dissoutes dans l'eau, même en présence de métaux étrangers. La réaction est des plus sensibles, car elle se produit encore lorsqu'il n'y a que $1/10\ 000$ de milligramme du métal dans 1 cent. cube de solution. Inversement, les sels de cuivre peuvent servir comme réactif de l'urobiline.

CHIMIOTHÉRAPIE
DES INFECTIONS STREPTOCOCCIQUES
PAR LES DÉRIVÉS
DU *p*-AMINOPHÉNYLSULFAMIDE

par M. et M^{me} J. TRÉFOUEL, F. NITTI et D. BOVET.

(*Laboratoire de chimie thérapeutique de M. E. FOURNEAU ;
Laboratoire des vaccins de M. A. SALIMBENI,
Institut Pasteur.*)

I

Domagk [3] a décrit un dérivé azoïque, le sulfamido-1 phénylazo-4-1' diamino-2'-4' benzène (prontosil) ayant la propriété de protéger la souris blanche contre l'inoculation d'une dose de streptocoques hémolytiques rapidement mortelle pour les témoins, substance dénuée de toxicité pour cet animal, possédant une action spécifique vis-à-vis du streptocoque et n'agissant qu'*in vivo*. Ses résultats ont été confirmés par Levaditi et Vaisman [7], par nous-mêmes [9] et par Colebrook et Kenny [2]. L'activité antiseptique de substances colorantes possédant une fonction sulfamide avait été antérieurement signalée par Jacobs et Heidelberger [6] qui ont décrit la sulfamidobenzène hydrocupréine.

Nous avons récemment montré [11] que la présence d'une fonction azoïque n'était pas nécessaire et que le *p*-aminophénylesulfamide (1162 F) exerce lui-même une action constante dans les septicémies streptococciques expérimentales du lapin et de la souris; cette action se manifeste, soit par un retard de la mort des animaux traités par rapport aux témoins, soit par une survie totale. Nos résultats ont été confirmés en France par Goissedet, Despois, Gailliot et Mayer [5], et en Angleterre par Colebrook et Kenny [2], ainsi que par Buttle, Gray et Stephenson [1].

L'activité thérapeutique d'une molécule aussi simple nous a amenés à étudier toute une série de substances voisines [4].

II

Comme test d'activité antistreptococcique, nous avons utilisé l'action protectrice qu'exercent ces substances sur la septicémie expérimentale de la souris blanche. Nous avons utilisé dans ces essais une souche de streptocoques hémolytiques humains très virulente ayant été isolée dans une septicémie puerpérale mortelle [souche Dig. 7] (1); cette souche (2) tue la souris à une dilution variant entre 1/200.000 et 1/2.000.000 de centimètre cube par voie intrapéritonéale, d'une culture en bouillon ascite au tiers âgée de dix-huit à vingt heures. Tous nos essais ont été pratiqués avec une dose dix fois mortelle de ce streptocoque. Seules ont été retenues les expériences où les souris témoins mouraient en vingt-quatre à quarante-huit heures d'une septicémie streptococcique vérifiée par l'examen microscopique du liquide péritonéal et souvent par la culture du sang. L'administration par voie buccale ou par voie sous-cutanée, répétée deux jours de suite, de doses de 0 gr. 0025 de substance par 20 grammes, assure, lorsque le médicament est actif, un retard dans la mort des animaux témoins.

Les notations suivantes ont été utilisées dans les tableaux qui suivent :

- ++, action sur tous les animaux se manifestant, soit par un retard de la mort, soit par une survie définitive.
- +, action sur tous les animaux se manifestant par un retard de la mort; survie définitive exceptionnelle.
- ±, retard inconstant.
- 0, aucune action.

(1) Nous remercions cordialement le Dr Digonnet qui a bien voulu nous donner cette souche.

(2) Nous avons antérieurement insisté sur le fait qu'il est indispensable d'utiliser, pour les essais, des souches de streptocoques hémolytiques très virulents, les streptocoques de faible virulence n'étant presque pas sensibles aux produits que nous avons étudiés [9]. Levaditi et Vaisman ont confirmé ce fait [8].

III. — RAPPORTS ENTRE LA CONSTITUTION CHIMIQUE ET L'ACTIVITÉ THÉRAPEUTIQUE DES DÉRIVÉS ÉTUDIÉS.

Partant du *p*-aminophénylsulfamide (1162 F), on envisagera successivement les modifications apportées à son activité :

1° Par la position relative de la fonction sulfamide et de la fonction aminée;

2° et 3° Par le remplacement de la fonction sulfamide par une autre fonction, et par des substitutions effectuées sur la fonction sulfamide;

4° et 5° Par le remplacement de la fonction amine par une autre fonction et par le blocage de l'amine;

6° Par l'adjonction d'une troisième fonction sur le noyau benzénique.

1° INFLUENCE DE LA POSITION RELATIVE DE LA FONCTION SULFAMIDE ET DE LA FONCTION AMINÉE. — La comparaison entre les trois isomères ortho-, méta- et para-phénylsulfamide (1162 F) a montré que le déplacement de l'amine dans le 1162 F fait disparaître l'activité thérapeutique presque totalement.

		K ⁰ s	ACTION
Type : <i>p</i> -aminophénylsulfamide		1162	++
Isomère <i>o</i> -aminé		1188	±
Isomère <i>m</i> -aminé		1173	±

Voici, à titre d'exemple, le protocole d'une expérience :

Fig. 7 : 1/200.000. Expérience du 19 décembre 1935. Traitement par 0 gr. 0025 par 20 grammes, voie buccale, solution dans HCl dilué (1) :

	JOURS							
	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	+							
—	+							
—	+							
—	+							
<i>o</i> -NH ² .C ⁶ H ⁴ SO ² NH ² (1188 F)	+							
—	+							
—	+							
—	V	+						

(1) Le signe + = mort; le signe V = survie.

$m\text{-NH}^2 \cdot \text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1173 F) . . .	+
— . . .	+
— . . .	+
— . . .	V +
$p\text{-NH}^2 \cdot \text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1162 F) . . .	V V V +
— . . .	V V V V V +
— . . .	V V V V V V V V
— . . .	V V V V V V V V

2° FONCTION SULFAMIDE SO^2NH^2 REMPLACÉE PAR DIVERSES FONCTIONS :

	ACTION
Par une fonction NH^2 : p -phénylènediamine	0
— CN : p -aminobenzonitrile	0
— SO^2H : acide sulfanilique	0
— AsO^3H^2 : atoxyl	0
— CONH^2 : p -aminobenzamide	1170 0

Le remplacement de la fonction sulfamide par une autre fonction conduit à des dérivés inactifs.

3° SUBSTITUTIONS SUR LA FONCTION SULFAMIDE :

	N ^o	ACTION
a) p -aminophényl-méthyl-sulfamide $\text{NH}^2 \cdot \text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NHCH}^3$	1219	++
p -aminophényl-éthyl-sulfamide	1222	++
p -aminophényl-butyl-sulfamide	1226	±
p -aminophényl-isobutyl-sulfamide	1228	±
p -aminophényl-allyl-sulfamide	1224	+
p -aminophényl-diméthyl-sulfamide	1230	++
p -aminophényl-diéthyl-sulfamide	1169	++
p -aminophényl-dipropyl-sulfamide	1232	±
b) p -acétylaminophényl-méthyl-sulfamide	1217	+
p -acétylaminophényl-éthyl-sulfamide	1223	+
p -acétylaminophényl-butyl-sulfamide	1227	±
p -acétylaminophényl-isobutyl sulfamide	1229	±
p -acétylaminophényl-allyl-sulfamide	1225	±
p -acétylaminophényl-diméthyl-sulfamide	1231	+
p -acétylaminophényl-diéthyl-sulfamide	1168	+
p -acétylaminophényl-dipropyl-sulfamide	1232	±
c) p -aminophényl-sulfanilide	1242	±
p -aminophényl-sulfobenzylamide	1244	±
p -aminophényl-sulfo- p -éthoxyanilide	1249	+
p -acétylaminophényl-sulfanilide	1241	±
p -acétylaminophényl-sulfobenzylamide	1243	±
p -acétylaminophényl-sulfo p -éthoxyanilide	1248	±
d) p -acétylaminophényl-sulfaminopropyldiéthylamine	1210	0

L'alcoylation de la fonction sulfamide ne supprime pas l'activité de ces substances, mais la diminue, au moins pour les termes supérieurs, proportionnellement au poids du radical alcoylé substitué.

Les dérivés à fonction amine libre sont beaucoup plus actifs que les dérivés acétylés correspondants. Butté et ses collaborateurs ont récemment retrouvé la faible activité du produit 1217 F; d'autre part, ces auteurs ont décrit les *p*-aminophénylsulfanilide $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHC}_6\text{H}_5$ et le dérivé acétylé correspondant; le premier de ces produits serait, d'après eux, très actif.

Voici le protocole d'une expérience portant sur les dérivés 1219 F et 1217 F.

Dig 7 : 1/200.000. Expériences du 2 mai 1936. Traitement par 0 gr. 0025 par 20 grammes, voie buccale :

	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	+							
—	+							
—	+							
—	+							
—	+							
<i>p</i> - $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ (1162 F)	V	+						
—	V	V	+					
—	V	V	V	V	V	V	+	
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>p</i> - $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHC}_6\text{H}_5$ (1219 F)	+							
—	V	V	V	V	+			
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHC}_6\text{H}_5$ (1217 F)	V	+						
—	V	+						
—	V	V	+					
—	V	V	+					
—	V	V	+					

4° REMPLACEMENT DE LA FONCTION AMINE PAR UNE AUTRE FONCTION :

	ACTION
<i>p</i> -oxyphénylsulfamide	1183 ±
<i>p</i> -méthylphénylsulfamide	0

Le dérivé phénolique et le dérivé méthylé correspondant au 1162 F ont été expérimentés; seul le premier est encore légèrement actif.

Fig. 7 : 1/20.000. Expérience du 11 décembre 1935. Traitement par 0 gr. 0025 par 20 grammes, voie buccale, solution dans NaOH dilué :

	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	+							
—	+							
—	+							
—	+							
$p\text{-NH}^2\text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1162 F)	V	V	+					
—	V	V	V	V	V	+		
—	V	V	V	V	V	V	+	
—	V	V	V	V	V	V	V	V
$p\text{-OHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1183 F)	+							
—	V	+						
—	V	+						
—	V	+						
$p\text{-CH}^3\text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$	+							
—	+							
—	+							
—	+							

5° DÉRIVÉS DE SUBSTITUTION SUR L'AMINE. — Les dérivés suivants ont été essayés avec plus ou moins de succès :

	ACTION
a) $p\text{-formylamino-phénylsulfamide}$	1201 +
$p\text{-acétylamino-phénylsulfamide}$	1172 +
$p\text{-carbétoxyamino-phénylsulfamide}$	1202 +
$\text{phénylsulfamide-}p\text{-aminoacétique}$	1186 $\pm$
$\text{phénylsulfamide-}p\text{-aminoacétamide}$	1185 $\pm$
$m\text{-acétylamino-phénylsulfamide}$	1184 0
$o\text{-acétylamino-phénylsulfamide}$ (dérivé fermé)	1189 0

Voici le protocole d'une expérience portant sur les produits actifs de ce groupe :

Fig. 7 : 1/200.000. Expériences des 11 et 15 décembre 1935. Traitement par 0 gr. 0025 par 20 grammes, voie buccale, solution dans NaOH dilué :

	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	+							
—	+							
—	+							
—	+							

$p\text{-NH}^2\text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1162 F)	V	V	+						
—	V	V	V	V	V	+			
—	V	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V	V
$p\text{-CH}^3\text{CONHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1172 F)	V	V	+						
—	V	V	+						
—	V	V	+						
—	V	V	V	V	V	V	V	V	V
$p\text{-C}^2\text{H}^5\text{CO}^2\text{NHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1202 F)	V	V	+						
—	V	V	+						
—	V	V	V	V	V	+			
—	V	V	V	V	V	V	V	+	
$p\text{-COOHCH}^2\text{NHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1186 F)	+								
—	+								
—	V	+							
—	V	V	V	+					
$p\text{-NH}^2\text{COCH}^2\text{NHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1185 F)	V	+							
—	V	+							
—	V	V	+						
—	V	V	V	+					
$p\text{-COHNHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1201 F)	V	V	+						
—	V	V	+						
—	V	V	+						
—	V	V	V	+					
ACTION									
b) $p\text{-acétylamino-sulfamido-}p\text{-phénylsulfamide}$	1182	±							
Urée symétrique du $p\text{-aminophénylsulfamide}$	1192	±							

sont également encore actifs.

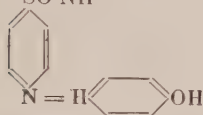
Fig. 7 : 1/200.000. Expériences des 9 décembre 1935 et 15 janvier 1936. Traitement par 0 gr. 0025 par 20 grammes, voie buccale, solution dans NaOH dilué :

	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	+							
—	+							
—	+							
—	V	+						
$p\text{-NH}^2\text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1162 F)	V	V	+					
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
$p\text{-CH}^3\text{CONHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NHC}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1182 F)	V	+						
—	V	+						
—	V	V	+					
—	V	V	V	+				

CO' <i>p</i> -NHC*H ⁴ SO ² NH*)* (1192 F)	+
—	V +
—	V +
—	V +

c) Fonctions azoïques avec groupes divers sur le second noyau benzénique :

Type oxy-4' phénylazo-1'4 phénylsulfamide
SO²NH²



ACTION

.	1101	+
Prontosil I		++
Oxy-4' méthyl-3'-phénylazo-1'4 phénylsulfamide	1102	+
Oxy-4' méthyl-2'-phénylazo-1'4 phénylsulfamide	1103	+
Dioxy-2'-4'-phénylazo-1'4 phénylsulfamide.	1108	++
Et son dérivé diéthylsulfamide.	1156	+
Oxy-4' méthoxy-3'-phénylazo-1'4 phénylsulfamide	1107	+
Oxy-4' méthoxy-2'-phénylazo-1'4 phénylsulfamide.	1136	+
Oxy-4'-diéthylaminopropylamino-3' phénylazo-1'4 phénylsulfa- mide	1141	±
Oxy-4'-diméthyl-2'-5' phénylazo-1'4-phénylsulfamide	1105	±
Oxy-2' diméthyl-3'-5' phénylazo-1'4-phénylsulfamide	1104	±
Oxy-4' propyl-3' méthyl-6'-phénylazo-1'4-phénylsulfamide.	1106	±
Trioxy-2'4'6' phénylazo-1'4-phénylsulfamide.	1171	+
Dioxy-4'6' éthoxy-2' phénylazo-1'4 phénylsulfamide	1190	+
Oxy-4' diéthoxy-2'-6' phénylazo-1'4 phénylsulfamide.	1191	+
Dioxy-4'6' éthyl-3' phénylazo-1'4 phénylsulfamide.	1139	+
Dioxy-4'6' propyl-3' phénylazo-1'4 phénylsulfamide	1140	+
Dioxy-4'6' hexyl-3' phénylazo-1'4 phénylsulfamide.	1095	+
Et son dérivé diéthylsulfamide.	1157	±

De nombreux dérivés à fonction azoïque ont été essayés. Nous ne rapporterons en détail ici que les résultats ayant trait à la *p*-sulfonamide chrysoïdine (Prontosil) et au dioxy-2'-4' phénylazo 1'4 phénylsulfamide (1108 F).

Fig. 7 : 1/200.000. Expériences du 6 novembre 1935. Traitement par 0 gr. 0025 + 20 grammes, voie buccale, solution dans HCl dilué (1162 F et prontosil), et dans NaOH dilué (1108 F) :

	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	+	—	—	—	—	—	—	—
—	+							
—	+							
—	+							
<i>p</i> -NH ² C*H ⁴ SO ² NH ² (1162 F)	V	V	V	+				
—	V	V	V	V	+			
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V

$(\text{NH}^2)_3\text{C}^6\text{H}^3\text{N} = \text{NC}^6\text{H}^3\text{SO}^2\text{NH}^2$ (prontosil) . . .	V	V	V	+					
— . . .	V	V	V	+					
— . . .	V	V	V	V	V	V	+		
— . . .	V	V	V	V	V	V	V	V	V
$(\text{OH})^2\text{C}^6\text{H}^3\text{N} = \text{NC}^6\text{H}^3\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1108 F)	V	V	+						
—	V	V	V	+					
—	V	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Fig. 7 : 1/200.000. Expériences du 21 avril 1935. Traitement par 0 gr. 0025 par 20 grammes, voie buccale :

	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	+	—	—	—	—	—	—	—
—	+							
—	+							
—	+							
—	+							
$p\text{-NH}^2\text{C}^6\text{H}^4\text{SO}^2\text{NH}^2$ (1162 F)	V	+						
—	V	V	V	+				
—	V	V	V	V	+			
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
$(\text{NH}^2)_3\text{C}^6\text{H}^3\text{N} = \text{NC}^6\text{H}^3\text{SO}^2\text{NH}^2$ (prontosil) . . .	V	V	+					
— . . .	V	V	+					
— . . .	V	V	V	+				
— . . .	V	V	V	+				
— . . .	V	V	V	+				
— . . .	V	V	V	V	V	V	V	V
— . . .	V	V	V	V	V	V	V	V
— . . .	V	V	V	V	V	V	V	V
— . . .	V	V	V	V	V	V	V	V
— . . .	V	V	V	V	V	V	V	V

6° ADJONCTION D'UNE TROISIÈME FONCTION SUR LE NOYAU BENZÉNIQUE :

	ACTION
a) Nitro-3 amino-4 phénylsulfamide	1207 0
Diamino-3-4 phénylsulfamide	1208 0
Chloro-2 acétylamino-4 phénylsulfamide	1200 ±
Méthyl-3 acétylamino-4 phénylsulfamide	1212 0
Méthyl-3 amino-4 phénylsulfamide	1221 0

Dig. 7 : 1/200.000. Expériences du 6 février 1936. Traitement par 0 gr. 0025 par 20 grammes, voie buccale :

	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoins	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+							
—	+							
—	+							
—	+							
—	+							
$p\text{-NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ (1'62 F)	V	V	V	V	+			
—	V	V	V	V	V	V	+	
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
—	V	V	V	V	V	V	V	V
$\text{CH}_3\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ (1221 F) . .	+							
—	+							
—	V	+						
—	V	+						
—	V	+						
$(\text{NH}_2)_2\text{C}_6\text{H}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ (1208 F) . . .	V	+						
—	V	+						
—	V	+						
—	V	+						
—	V	+						

L'adjonction d'une troisième fonction, surtout en position méta par rapport à la fonction sulfamide, dans la molécule du 1162 F, est nettement défavorable au point de vue thérapeutique. Comme exemple particulièrement probant de ce fait, on peut citer l'inactivité du diamino-3-4 phénylsulfamide (1208 F) et du méthyl 3 amino-4 phénylsulfamide (1221 F).

	ACTION
b) Méthyl-4 acétylamino-3 phénylsulfamide	1211 0
Amino-3 oxy-4 phénylsulfamide	1163 0
Formylamino-3 oxy-4 phénylsulfamide	1181 0
Acétylamino-3 oxy-4 phénylsulfamide	1174 0
Amino-3 méthyl-4 phénylsulfamide	1165 0

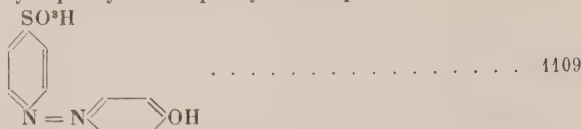
sont également dépourvus d'activité.

7° FONCTION SULFAMIDE REMPLACÉE PAR DIVERSES FONCTIONS DANS LES DÉRIVÉS AZOÏQUES ACTIFS DU § 5° c. — Certains des dérivés azoïques du *p*-aminosulfamide ayant manifesté une action intéressante sur le streptocoque de la souris, nous avons préparé

et essayé les dérivés correspondants dans lesquels la fonction sulfamide était remplacée :

a) *Par l'acide sulfonique :*

Types : acide oxy-4'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique



Acides : Oxy-4' méthyl-5'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique . .	1110
Oxy-4' méthyl-2'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique . .	1111
Dioxy-2'4' phénylazo-1'4 phénylsulfonique.	1116
Oxy-4' méthoxy-2'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique .	1117
Oxy-4' méthoxy-3'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique .	1115
Oxy-2' diméthyl-3'-5'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique.	1112
Oxy-4' diméthyl-3'-6'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique.	1113
Oxy-4' méthyl-6' isopropyl-3'-phénylazo-1'4 phényl- sulfonique	1114
Dioxy-2'4' hexyl-3'-phénylazo-1'4 phénylsulfonique .	1092

b) *Par l'acide arsinique :*

Acides : oxy-4'-phénylazo-1'4 phénylarsinique	1120
Oxy-4'-méthyl-5'-phénylazo-1'4 phénylarsinique . . .	1121
Oxy-4'-méthyl-2'-phénylazo-1'4 phénylarsinique. . .	1122
Oxy-6' diméthyl-3'5'-phénylazo-1'4 phénylarsinique .	1123
Oxy 4' diméthyl-2'5'-phénylazo-1'4 phénylarsinique .	1124
Oxy-4' méthyl-2' isopropyl-5'-phénylazo-1'4 phényl- arsinique.	1125
Oxy-4' méthoxy-3'-phénylazo-1'4 phénylarsinique. .	1126
Dioxy-2'4'-phénylazo-1'4 phénylarsinique	1127
Oxy-4' méthoxy-2'-phénylazo-1'4 phénylarsinique. .	1123

c) *Par des substituants divers, le reste de la molécule étant l'azoïque de l'hexylrésorcine :*

Dioxy-2'-4' hexyl-5' phénylazo-1'4-benzonitrile. . . .	1155
Dioxy-2'-4' hexyl-5' phénylazo 1'4-benzamide	1143
Dioxy-2'-4' hexyl-5' phénylazo-1'4-phénylacétonitrile.	1144
Acides : Dioxy-2'-4' hexyl-5' phénylazo-1'4-phénétol	1100
Dioxy-2'-4' hexyl-5' phénylazo 1'4-phénylarsinique. .	1088
Dioxy-2'-4' hexyl-5' phénylazo 1'4-diarsinique-1-2. . .	1137
Dioxy-2'-4' hexyl-5' phénylazo-1'1-naphtalène trisul- fonique-4-6-8	1138

Tous ces corps sont dépourvus d'activité.

8° DÉRIVÉS INACTIFS APPARTENANT A DIVERSES SÉRIES CHIMIQUES.

— Les dérivés suivants se sont montrés dépourvus de toute action :

a) *Acides arsenicaux benzéniques :*

Urée de l'acide <i>p</i> -aminophénylarsinique	498
Acide amino-5 phényldiarsinique-1-2	801
Acide oxy-3' phényldiarsinique-1'4' azo-6'4 phényldiarsinique-1-2	891
Arséno de l'acide acétylamino-3 phénoxy acétique-4 arsinique	841

b) *Dérivés quinoléiniques :*

Sulfamide-6 quinoléine	1209
Diéthylamino amylamino-8 quinoléine	747
Diéthylaminopropylamino-8 méthoxy-6 amino-5 quinoléine	783
Diéthylaminopropylamino-8 nitro-5 quinoléine	774
Diéthylaminoundecylamino-8 méthoxy-6 quinoléine	852
α -diéthylamino β -diméthyl γ -phényl γ -propylamino-8 méthoxy-6 quinoléine	1073

c) *Dérivés du naphthalène :*

Amino-5 naphthalène sulfamide-8	1194
Son dérivé acétylaminé	1193
α -diéthylamino β -oxypropyl naphthalène-1	482
Acide acétylamino-6 naphthalène arsinique-2	874

d) *Dérivés des phénoxazines :*

Chlorure de diamino-5-7 sulfamido-3 phénoxazonium	1130
Dinitro-5-7 diéthylamino-propyl N-phénoxazine	1017
Chlorure de l'acide sulfo-5 amino-7 phénoxazoniumarsinique-3	977
Acide sulfo-7 nitro-5 phénoxazinearsinique-3	978
Arséno de l'acide sulfo-7 amino-5 phénoxazine arsinique-3	979
Diamino-2-5 phénoxazine sulfonate de potassium-7	987

e) *Urotropine et ses dérivés :*

Iodoéthylate d'urotropine	788
Iodopropanolate d'urotropine	825
Iodoéthanolate d'urotropine	789
Iodométhylate d'urotropine	790
Chlorobenzylate d'urotropine	792

f) *Divers :*

Diméthylaminoéthoxy-1 benzyloxy-2 benzène	1083
Diéthylaminométhylbenzmorpholine	1161
Ditéthylamino-propylaminohydrindène	773
N (diéthylamino-propyl) <i>m</i> -méthoxy benzhydramine	778
Diméthylamino-1 diméthyl-2 éthyl-3 cinnamoylpropanol-3	1075
Bis (diéthylamino 3 propyl) méthylamine	1041
Acide iodo-4 phénoxyacétique	678
Acide diméthyl-2-4-phénoxyacétique	642
205-Bayer-309-Fourneau	309

IV

L'intérêt présenté par les résultats obtenus dans l'infection streptococcique de la souris, nous a incités à faire quelques essais sur le lapin. Nos expériences ont porté, en premier lieu, sur les produits suivants : 1162 F, 1168 F, 1169 F, 1172 F, 1195 F, 1108 F et sur le prontosil. L'expérimentation effectuée sur ces différentes substances nous ont permis de retrouver les résultats obtenus chez la souris. C'est ainsi que le *p*-aminobenzonitrile (1170 F) et le *p*-aminoacétonitrile, et même le *m*-aminophénylsulfamide (1173 F) inactifs chez la souris, n'ont montré également aucune action protectrice sur le lapin. Le dérivé acétylé, 1172 F, le *p*-aminophényldiéthylaminosulfamide et son dérivé acétylé (1168 F et 1169 F) ainsi que différents azoïques (1108 F et 1195 F et prontosil) protègent le lapin ou lui assurent une survie de quelques jours par rapport aux témoins.

Les expériences sur le lapin ne se prêtent pas mieux à des essais comparatifs que celles effectuées sur la souris, et nous avons poursuivi nos expériences en utilisant exclusivement le plus simple de ces dérivés, le 1162 F, qui nous a paru en même temps le plus actif. Nous l'avons employé, non seulement par voie buccale sous forme d'amine libre, ou en solution, soit sodique, soit chlorhydrique, mais encore par voie intraveineuse.

Par cette voie, les doses actives pour le lapin sont environ quatre fois moindres que les doses agissant *per os*. La toxicité n'a pu être déterminée, l'acidité de la solution ne permettant pas d'inoculer des doses très élevées de ce produit. En effet, le *p*-amino-phénylsulfamide n'est pratiquement pas toxique pour les animaux et malgré l'administration de doses considérables (5 grammes par kilogramme au lapin par voie buccale, par exemple), nous n'avons jamais pu déceler de troubles attribuables à une intolérance à cette substance.

ACTION PROTECTRICE DU *p*-AMINO-PHÉNYLSULFAMIDE CHEZ LE LAPIN.
— Nous avons utilisé pour le lapin un streptocoque hém-

lytique d'origine animale extrêmement virulent (souche Pion). Ce germe nous a été donné par M. Cotoni que nous tenons à remercier vivement.

1/10.000 de centimètre cube d'une culture de ce germe en bouillon sérum au 1/4 âgée de vingt heures tue régulièrement le lapin. Nous avons employé dans tous nos essais une dose vingt fois plus forte.

L'action du *p*-amino-phénylsulfamide est préventive et curative.

L'administration par voie buccale de 1 gramme par kilogramme d'animal du *p*-amino-phényl-sulfamide, vingt-quatre heures avant l'inoculation streptococcique, n'assure généralement qu'un retard de quelques jours sur les témoins, mais, dans la plupart des cas, cette survie ne dépasse pas une semaine. Il est à noter qu'il s'agit d'une infection streptococcique extrêmement sévère et que les témoins meurent constamment dans les vingt-quatre heures qui suivent l'inoculation.

L'administration aux mêmes doses de *p*-amino-phénylsulfamide par voie buccale huit heures avant l'inoculation assure soit un retard de plusieurs jours, soit même une survie définitive.

Voici le protocole d'une de nos expériences :

Dans cette expérience, les 2 lapins traités huit heures avant l'inoculation ont survécu. Ce fait n'est d'ailleurs pas constant et généralement on n'obtient une survie définitive que chez la moitié des lapins traités.

L'administration par voie buccale d'une dose de 1 gramme par kilogramme de *p*-amino-phényl-sulfamide de deux heures à huit heures après l'inoculation streptococcique et répétée deux jours de suite, assure chez les lapins traités un retard constant de leur mort sur celle des témoins ou des survies définitives dont le nombre varie entre un tiers et la moitié des lapins en expérience (1).

Il est intéressant de suivre l'évolution de l'hémoculture

(1) Le fait que le Prontosil, comme le 1162 F, agit sur les infections déjà déclarées, ne plaide pas en faveur de l'hypothèse émise par Levaditi et Vaisman [8] sur la différence de sensibilité aux agents chimiques des souches de streptocoques « vitalisées » et « non vitalisées ».

Expérience du 28 novembre 1925. — Streptocoque hémolytique pion.
 Culture de vingt heures en bouillon sérum au 1/4. Dose : 4 500 de centimètre cube par voie intracutane.

	22 NOVEMBRE	23 NOVEMBRE	24 NOVEMBRE	25 NOVEMBRE	1 ^{er} DÉCEMBRE	2 ^e DÉCEMBRE	3 ^e DÉCEMBRE	4 ^e DÉCEMBRE	5 ^e DÉCEMBRE
Premier témoin. Lapin n° 23 (2 kilogram. 126).	+								Sang lysé, strep- tocoques.
Deuxième témoin. Lapin n° 29 (2 kilogram. 126).	+								Sang lysé, strep- tocoques.
Vingt quatre heures avant l'inoculation p-anilino-phényl-sulfamide, 4 grammes par kilo- gramme (see basile). Lapin n° 59 (2 kilogram. 356), brûlé le 26 novembre, inoculé le 27 novembre.	+	+	+	+	+	+	+	+	Sang lysé, strep- tocoques.
Vingt quatre heures avant l'inoculation p-anilino-phényl-sulfamide, 4 grammes par kilo- gramme (see basile). Lapin n° 54 (2 kilogram. 370), brûlé le 26 novembre, inoculé le 27 novembre.	+	+	+	+	+	+	+	+	Sang lysé, strep- tocoques.
Huit heures avant l'inoculation p-anilino-phényl-sulfamide, 4 grammes par kilo- gramme (see basile). Lapin n° 52 (2 kilogram. 526).	+	+	+	+	+	+	+	+	Sang lysé, strep- tocoques.
Huit heures avant l'inoculation p-anilino-phényl-sulfamide, 4 grammes par kilo- gramme (see basile). Lapin n° 53 (2 kilogram. 536).	+	+	+	+	+	+	+	+	Sang lysé, strep- tocoques.

1/4 de dose. — 1/4 de dose. — 1/4 de dose. — 1/4 de dose.

chez les lapins traités. Dans la plupart des cas, l'hémoculture se montre négative durant les deux ou trois jours qui suivent l'inoculation. Avec les traitements préventifs pratiqués vingt-quatre heures avant l'inoculation on assiste parfois à l'apparition de streptocoques dans le sang le lendemain du traitement, ces germes disparaissant dans les jours suivants.

L'hémoculture reste ainsi négative pendant un temps variable entre trois et six jours, puis, dans la moitié des cas, des streptocoques apparaissent dans le sang et l'animal succombe le lendemain ou le surlendemain à la suite d'une septicémie streptococcique avec lésions typiques et lyse totale du sang.

Si, dès que l'hémoculture redevient positive, on traite à nouveau les animaux, il n'est pas exceptionnel de constater que le sang est stérilisé dès le lendemain. Néanmoins, presque constamment, l'animal succombe dans les deux ou trois jours qui suivent. A l'autopsie, on ne trouve pas de lésions apparentes, la rate est petite, le sang non lysé et enfin la culture du sang ne permet pas de déceler la présence de streptocoques. La mort peut être due soit à des phénomènes toxiques produits par la lyse brutale des germes, soit à des lésions que la septicémie avait provoquées et auxquelles l'animal n'a pu survivre.

En résumé, l'administration préventive ou curative du *p*-amino-phényl-sulfamide exerce une action des plus nettes dans les septicémies streptococciques expérimentales du lapin.

Cette action se manifeste soit par un retard constant de la mort des animaux traités par rapport aux témoins, soit par une survie définitive du tiers ou de la moitié des animaux en expérience.

RÉACTION DES ANIMAUX GUÉRIS PAR LA CHIMIOTHÉRAPIE DEVANT UNE NOUVELLE INFECTION STREPTOCOCCIQUE. — Nous avons cherché si les animaux guéris par l'administration du *p*-amino-phényl-sulfamide présentaient des réactions différentes de celles d'un animal neuf vis-à-vis d'une nouvelle infection streptococcique expérimentale.

Nous avons utilisé des souris et des lapins.

Ces essais ont été pratiqués à maintes reprises sur des souris qui avaient résisté trente jours auparavant à une inoculation de streptocoques rapidement mortelle pour les témoins.

A de très rares exceptions près, cette nouvelle inoculation entraîne la mort des animaux et il est exceptionnel d'observer soit un retard sur les témoins, soit une survie totale.

Les essais sur le lapin se montrent encore plus typiques.

2 lapins qui avaient été protégés par l'administration buccale du *p*-amino-phényl-sulfamide respectivement seize et vingt-cinq jours auparavant se sont comportés comme des animaux neufs vis-à-vis d'une nouvelle infection streptococcique. Il est à noter que ces animaux étaient en parfaite santé et que leur poids avait augmenté depuis la première expérience.

D'autre part, le sérum des animaux guéris ne s'est jamais montré au cours de nos expériences doué de pouvoir agglutinant pour le streptocoque utilisé lors de l'inoculation.

Les animaux traités et guéris par la chimiothérapie présentent-ils, lors d'une nouvelle inoculation, des phénomènes de chimio-résistance?

Nous nous sommes adressés à la souris et de l'ensemble de nos expériences on peut conclure que les sujets traités se comportent comme des animaux neufs. En effet, si l'on administre par voie buccale du *p*-amino-phényl-sulfamide à des souris ayant survécu à une infection antérieure et qu'on leur inocule par voie intrapéritonéale dix doses mortelles de streptocoques, ces animaux présentent vis-à-vis des témoins des survies prolongées ou définitives.

En conclusion, les animaux traités par le *p*-amino-phényl-sulfamide ayant résisté à une infection streptococcique expérimentale n'acquièrent pas d'immunité contre ce germe et succombent en même temps que les témoins lors d'une inoculation ultérieure.

D'autre part, ces animaux ne présentent pas de chimio-résistance vis-à-vis du *p*-amino-phényl-sulfamide et peuvent être protégés par cette substance comme des animaux neufs contre une nouvelle inoculation streptococcique.

CONCLUSIONS.

1° Nous rapportons les résultats d'essais thérapeutiques effectués *in vivo* sur l'infection streptococcique de la souris.

Le *p* amino-phényl-sulfamide (1162 F) constitue le noyau actif de tous les corps que nous avons étudiés. En effet, parmi les 116 substances utilisées, 28 d'entre elles, qui toutes dérivent du 1162 F, ont présenté une action plus ou moins importante sur l'infection expérimentale.

2° Nous avons envisagé successivement les modifications apportées à l'activité du *p*-amino-phényl-sulfamide par des transformations de sa constitution chimique. Seul l'isomère *p*-amino-phényl-sulfamide s'est montré actif; les dérivés ortho et méta sont dépourvus d'efficacité thérapeutique. Le remplacement de la fonction sulfamide par d'autres fonctions chimiques a constamment conduit à des produits inactifs. Le remplacement d'une fonction amine par un autre radical ou le blocage de l'amine, n'améliore pas et diminue même dans la plupart des cas ou fait disparaître les propriétés antistreptococciques. L'adjonction d'une troisième fonction sur le noyau benzénique, surtout en position méta par rapport à la fonction sulfamide, est nettement défavorable.

3° L'action préventive ou curative du *p*-amino-phényl-sulfamide et de ses dérivés assure un retard de la mort ou la survie sur des lapins infectés par une souche virulente de streptocoques hémolytiques. Les animaux qui ont ainsi survécu ne présentent aucune immunité lors d'une nouvelle inoculation, se comportant à tous points de vue comme des animaux neufs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BUTTLE (A.), GRAY (W.), STEPHENSON (D.). *The Lancet*, **230**, 1936, p. 1286.
- [2] COLEBROOK (L.), KENNY (M.). *The Lancet*, **230**, 1936, p. 1279.
- [3] DOMAGK (G.). *Deutsche med. Woch.*, **61**, 1935, p. 250.
- [4] FOURNEAU (E.), TRÉFOUEL (J. et M^{me} J.), NITTI (F.), BOVET (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **122**, 1936, p. 238 et **122**, 1936, p. 652.
- [5] GOISSEDET (P.), DESPOIS (R.), GAILLIOT (P.), MAYER (R. L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, 1936, p. 1082.
- [6] JACOBS (W. A.), HEIDELBERGER (M.). *Journ. Amer. Ch. Soc.*, **41**, 1919, p. 2183.
- [7] LEVADITI (C.), VAISMAN (A.). *C. R. Ac. Sc.*, **200**, 1935, p. 1694.
- [8] LEVADITI (C.), VAISMAN (A.). *La Presse Méd.*, 1935, p. 2100.
- [9] NITTI (F.), BOVET (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1933, p. 1277.
- [10] NITTI (F.), BOVET (D.). *C. R. Ac. Sc.*, **202**, 1936, p. 1221.
- [11] TRÉFOUEL (J. et M^{me} J.), NITTI (F.), BOVET (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 755.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LES BOUGIES FILTRANTES

par ITALO PERAGALLO, assistant.

(*Institut d'Hygiène expérimentale de l'Université de Pavie.*
Directeur : Prof. E. BERTARELLI.)

Les filtres destinés à l'aseptisation de produits liquides de différente nature (depuis l'eau jusqu'aux toxines, aux anti-virus, aux bactériophages, etc.) reçoivent une application toujours plus vaste. Si dans les applications pratiques, ayant pour but la purification des eaux, ces filtres ont cédé le pas à des méthodes chimiques ou physico-chimiques plus rapides et moins coûteuses, ils ont, d'autre part, vu leur application s'étendre dans la technique des laboratoires biologiques et dans celle des préparations pharmacologiques.

La production de filtres bactériologiques s'est étendue dans bien des pays; rien qu'en ce qui concerne l'Italie, on connaît plusieurs marques de fabrication de matériel destiné à des filtrations microbiennes. Il semble cependant plutôt singulier que, malgré l'ample diffusion de ce moyen d'aseptisation, les recherches exactes sur la structure, la valeur et la signification de ces filtres manquent presque totalement. Tandis qu'on a fait de nombreuses recherches sur ce qu'on nomme les ultra-filtres, notamment en ce qui concerne l'étude des caractéristiques des colloïdes, on ne trouve rien sur ce système spécial de stérilisation. Dans la plus récente littérature sur la filtration, on trouve bien plusieurs ouvrages qui ont comme point de départ l'étude des filtres, mais aucun d'entre eux ne s'occupe en détail de la connaissance des filtres bactériologiques.

Même les maisons qui produisent les filtres ne donnent jamais d'indications précises sur la structure réelle de leurs produits commerciaux. Les classifications des différents filtres sont établies avec des critères qui ont peu affaire avec les carac-

téristiques techniques des filtres mêmes; par exemple, les bougies Chamberland, qui méritent à juste titre leur vaste renommée, portent des indications de lettres et de numéros progressifs, qui donnent bien une idée d'une différence de compacité du matériel filtrant, mais qui ne permettent aucune déduction sur la diversité structurale des filtres. En général, les maisons se bornent à déclarer, moyennant le contrôle bactériologique, si un filtre donné retient les germes, présents dans les liquides qu'ils filtrent, à des pressions définies, a , b , c . Cela représente une méthode qui, quoique pratique, est encore proche de l'empirisme. Il est vrai que l'on sait que les pores ou les pores-canaux des supports filtrants ont des diamètres supérieurs à ceux des bactéries ordinaires et l'on répète par conséquent dans les traités que l'arrêt des germes par les filtres a lieu en vertu du pouvoir adsorbant du support. Mais ce qui fait défaut, ce sont les notions exactes sur la valeur du calibre des pores, leur forme, leur distribution, leur nombre, etc...

Il m'a été impossible, dans tous les ouvrages que j'ai consultés, de trouver des indications de quelque valeur pratique sur la connaissance de la structure intime des matériaux filtrants, et je n'ai pu trouver de détails sur la technique à suivre pour des recherches de cet ordre. Dans une leçon orale, j'ai entendu faire état de la possibilité d'étudier les filtres morphologiquement en les immergeant dans de la gélatine fondue, colorée avec de l'éosine, en produisant ensuite une forte dépression sous cloche, de sorte que la gélatine occupe les pores, et en laissant sécher. Après, on fixe au formol et l'on fait des coupes macroscopiques, qui sont rendues semi-macroscopiques et bien observables en les faisant passer sur des abrasifs, qui en diminuent l'épaisseur. J'ai fait plusieurs essais avec cette méthode qui n'a cependant pas donné, en pratique, les résultats désirés parce que la consistance différente des deux matériaux interdisait le traitement des coupes sur les abrasifs.

Après maintes tentatives, j'ai décidé d'appliquer aux coupes de bougies la technique dont on se sert en histologie pour l'étude des coupes d'os non décalcifié. Voici schématiquement les différents temps de la méthode.

On fixe avec du baume sec fondu à chaud, des coupes de bougie de quelques millimètres à de petits verres. Cette opération est beaucoup facilitée si l'on possède un support de Malassez, sur la plaque duquel on étale les verres. Après le refroidissement et après que l'on a constaté l'adhérence de la petite partie de bougie, on la polit avec du papier de verre à grains différents, en ordre décroissant, c'est-à-dire en allant des papiers à grains fins à ceux à grains très fins. Lorsque l'on estime que cette surface est uniforme, on réchauffe de nouveau le verre et l'on transporte la coupe sur un autre verre, en faisant cependant adhérer la surface polie. Sur la nouvelle surface, on répète le même polissage. Ces opérations terminées, on

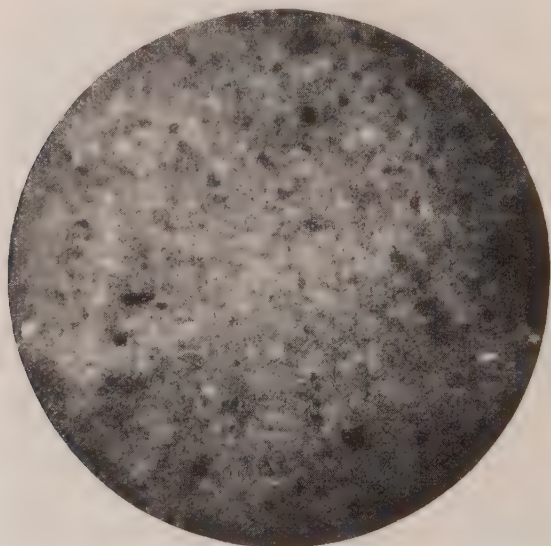


FIG. 4. — Chamberland L7.

monte au baume. Le principe de la méthode est basé exclusivement sur le fait que l'air contenu dans l'épaisseur des pores vient à se trouver entre deux couches de baume, qui, ayant un index de réfraction différent de celui de l'air, en facilitent la vision par contraste, et l'on a indirectement la notion des dimensions, du nombre, etc., des pores. Cette méthode est d'exécution très facile, rapide et constante.

Avant de passer à l'étude des coupes ainsi effectuées et des résultats obtenus en ce qui concerne les questions que je me suis posées, j'ai cru bon de faire précéder quelques considérations sur la porosité et la perméabilité des bougies, pour voir comment la vue théorique de celles qui sont leurs principales propriétés s'approche de la réalisation pratique obtenue indus-

triellement sur les divers échantillons que j'ai eu l'occasion d'examiner. Tout d'abord, la porosité des bougies ne dépend pas tant de la nature des particules dont elles sont composées, que de leur forme, des dimensions et de la manière dont elles sont disposées les unes par rapport aux autres. Le degré de porosité est déterminé par le rapport entre le volume total des pores ou interstices qui se trouvent entre les particules des matériaux et le volume apparent des matériaux eux-mêmes.

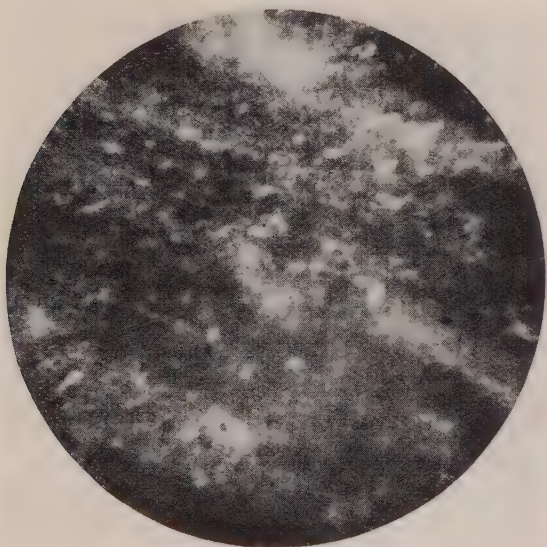


FIG. 2. — Chamberland L3.

Le volume des différents pores d'un matériel homogène, à parité de forme et de dimensions des grains, varie, selon la manière dont ceux-ci sont disposés, et conséquemment, suivant les différentes dispositions, la porosité du matériel varie aussi. On peut donner de ce fait une démonstration mathématique, en considérant le cas le plus simple, où les matériaux résultent de grains parfaitement sphériques et d'égale grosseur. En ce cas, il peut se vérifier un maximum de condensation du matériel quand chaque petite sphère est logée dans l'interstice laissé par quatre autres sphères placées au-dessous en contact entre elles, et un minimum de condensation quand,

au contraire, chaque sphère est appuyée sur le sommet d'une seule qui se trouve en dessous, toutes les sphères étant ainsi placées en séries régulières les unes sur les autres. Actuellement, je n'ai pu étudier les dimensions des granules, leur forme et leur distribution, car je traitais un matériel congloméré et je n'aurais pu me prémunir contre les éventuelles actions artificielles qu'on y aurait apportées en le réduisant en poudre, et en second lieu parce que j'ai appris un détail de

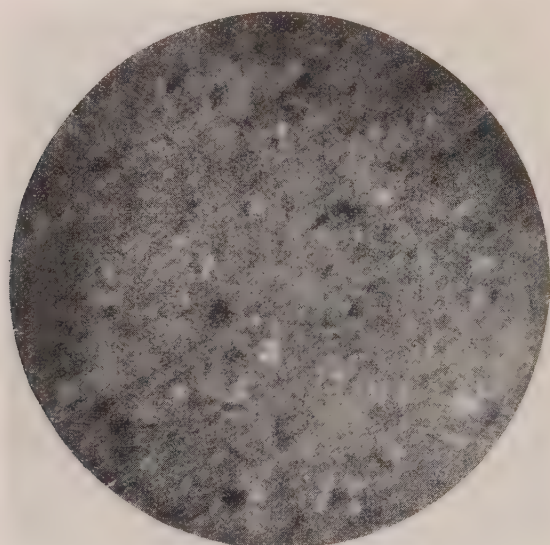


FIG. 3. — Chamberland L5.

technique qui ôte toute signification à une recherche en ce sens : c'est-à-dire que les fabricants empâtent avec le matériel de la poussière de charbon, qu'ils éliminent ensuite par calcination, remplaçant ainsi la formation physique des pores par une formation artificielle.

Pour ce qui concerne la perméabilité des bougies, c'est un fait qu'elle dépend de la porosité, mais non en rapport direct avec celle-ci ; c'est-à-dire que la perméabilité ne suit pas la variation du volume total des pores, mais celle de leur grandeur, de leur forme et de leur disposition. En effet, si l'on examine des coupes différentes quant à leur structure, on remar-

que que tout en ayant des pores de volume à peu près égal, elles peuvent présenter une perméabilité fort différente. Les matériaux à gros grains à égal volume des pores ont un nombre de ceux ci inférieur à celui des matériaux formés de particules plus fines; mais justement à cause de cela les premiers ont leurs pores bien plus gros que les seconds.

Les liquides qui doivent traverser les premiers, toutes autres conditions égales, rencontrent beaucoup moins de résistance qu'à passer par les seconds, car les canaux formés par les

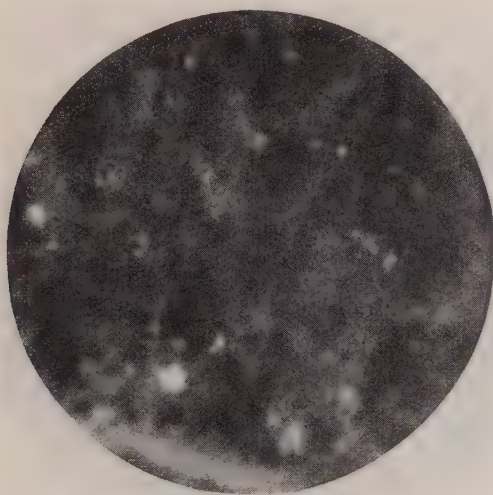


FIG. 4. — Soc. Ceram. Bergam N. X.

pores des matériaux à gros grains sont moins longs, moins tortueux, plus larges, et par conséquent présentent une surface solide de frottement beaucoup moins étendue que les petits canaux formés par les pores des matériaux à grains fins.

Les matériaux formés de mélanges de grains de grosseurs différentes ont une perméabilité qui s'approche de celle des matériaux à granules plus fins.

L'écoulement des liquides a lieu plus ou moins rapidement selon la résistance plus ou moins grande qu'ils rencontrent en parcourant la surface des particules solides qui composent le matériel filtrant

L'écoulement sera donc d'autant plus lent que cette surface sera plus vaste à parité de volume de matériel, car la surface même augmente rapidement si la division du matériel est plus grande.

Si l'on considère le cas d'un matériel très homogène, c'est-à-dire avec des pores formés de petits canaux réguliers, on peut comparer ces derniers aux tubes capillaires, dans lesquels la vitesse d'écoulement d'un même liquide pour des tubes d'égale longueur diminue selon la quatrième puissance du diamètre,

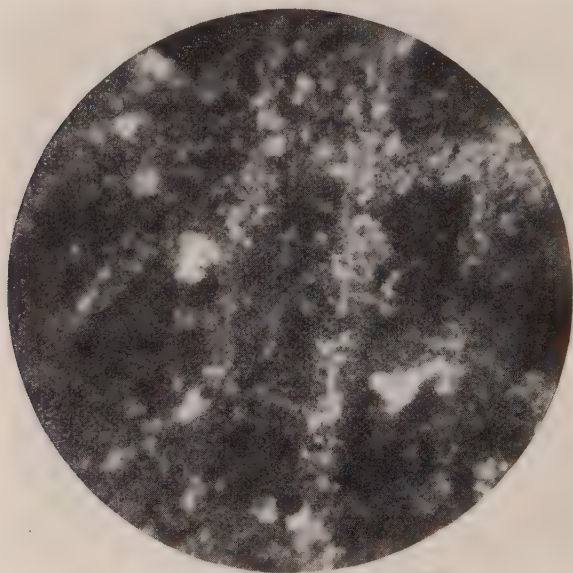


FIG. 5. — Soc. Ceram Bergam N8.

elle se réduit donc de $1/10.000$ quand le diamètre du tube est réduit de $1/10$.

Ces considérations d'ordre général faites, j'ai appliqué la méthode indiquée à l'étude des coupes de bougies des différents types : Chamberland, Berkefeld, Lete, Società Ceramiche Bergamasche. Quelques microphotographies annexées à ce travail illustreront les observations faites.

Chamberland L.3 : calibre des pores (valeurs moyennes) μ 28×28 ; forme plutôt ronde ; nombre par champ microscopique : 40-60 ; distribution uniforme et régulière.

Chamberland L. 5 : calibre des pores $\mu 20 \times 20$; forme plutôt ronde ; nombre par champ microscopique : 20-30 ; distribution uniforme et régulière.

Chamberland L. 7 : Calibre moyen $\mu 15 \times 15$; forme plutôt ronde ; nombre par champ microscopique : 10-14 ; distribution uniforme et régulière.

Lete : Calibre $\mu 100 \times 120 - \mu 30 \times 30 - \mu 90 \times 120$; forme très irrégulière ; nombre par champ microscopique, 10-15 ; distribution irrégulière.

Berkefeld : calibre des pores $\mu 70 \times 100 - \mu 30 \times 30 - \mu 100 \times 120$; forme plutôt ronde ; nombre, 12-14 ; distribution assez régulière.

Soc. Cer. Berg. N. 8 : calibre des pores $\mu 30 \times 30$; forme plutôt ronde ; nombre, 10-14 ; distribution assez régulière.

Soc. Cer. Berg. N. 7 : calibre des pores $\mu 28 \times 28$; forme plutôt ronde ; nombre par champ microscopique, 40-50 ; distribution régulière.

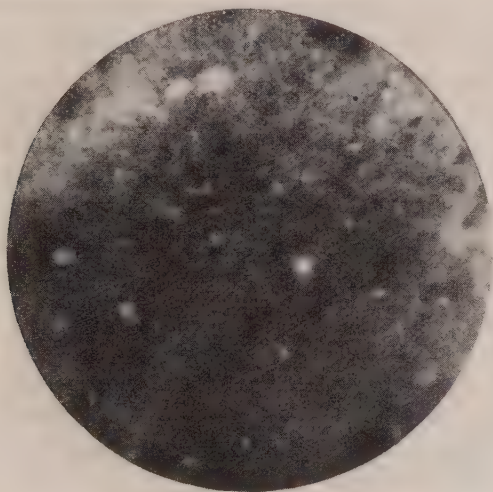


FIG. 6. — Soc. Ceram, Bergam N7.

Soc. Cer. Berg. N. X. : calibre des pores $\mu 20 \times 20$; forme plutôt ronde ; nombre, 30-40 ; distribution régulière.

Des données ci-dessus, on peut tirer les déductions suivantes :

Dans les rapports de la perméabilité des bougies, les données pratiques de construction correspondent aux qualités requises théoriquement. En effet, les filtres plus perméables, par exemple, les Lete et les Berkefeld ont un nombre de pores qui oscille de 10 à 14, tandis que le Chamberland L. 3, L. 5, L. 7, et le type N. X. des Céramiques Berg. présentent un nombre de pores qui va de 30-40 à 40-50 ; les premiers, cependant,

ont des diamètres maxima de dimensions beaucoup plus élevées. En outre, la perméabilité est en rapport avec la forme du pore-canal : par exemple, les pores des filtres Lete, qui sont les plus perméables, présentent une forme irrégulière, tandis que ceux des filtres Berkefeld, aussi très perméables, ont une forme qui s'approche de la forme ronde, donc plus régulière ; elles ne diffèrent pas seulement en cela, mais aussi par la distribution des pores, qui, dans ces dernières, est beaucoup plus régulière et uniforme.

La filtration est d'autant plus efficace pour les microbes que la forme des pores est plus régulière et plus ronde, que ceux-ci sont distribués plus uniformément et que leur nombre ne dépasse pas une certaine limite dans l'unité de surface : par exemple, Chamberland L. 5, L. 7, et Soc. Cer. Berg. N. X. La meilleure moyenne rencontrée dans les bougies examinées, en prenant comme unité de surface le champ microscopique (obtenu avec le système optique suivant : ocul. N. 3, object. 12×15 mm. 0,30 Koritzk.), est de 10-15 pores pour les types très denses, comme par exemple les Chamberland L. 7, de 20-30 pour les types comme les Chamberland L. 5, et de 40-60 pour les types comme les Chamberland L. 3.

Au-dessus de ces moyennes, la filtration des microbes n'est pas sûre et il n'est pas à conseiller de les dépasser, sauf pour les bougies destinées à des purifications grossières, où il convient d'arriver au type Berkefeld.

Le calibre moyen des pores devrait osciller, dans le cas d'une bonne bougie pour filtration des microbes, dans les limites de $20 \times 20 - 15 \times 15 \mu$. En effet, la Chamberland L. 5 présente des valeurs de $20 \times 20 \mu$, le type L. 7 de $15 \times 15 \mu$, et le type N. X. de la Soc. Cer. Berg. de $\mu 20 \times 20$; au-dessus de ces valeurs, la filtration devient incertaine et inconstante. Au-dessus de $30 \times 30 \mu$ de calibre des pores, on n'a plus aucune garantie de filtration des microbes.

Un autre facteur important est la régularité des diamètres maxima des pores, et, par conséquent, leur forme plutôt ronde. Celle-ci, sans tenir compte des particularités techniques de fabrication, est obtenue, très vraisemblablement, avec des matériaux à grains fins, qui se disposent sous l'effet de la compression selon la première manière citée dans le para-

graphe qui s'occupe de la formation des pores. Ainsi, à parité d'autres coefficients, l'épaisseur totale des bougies interviendra, car il est évident que des bougies de plus grande épaisseur ont des possibilités d'arrêt plus grandes que celles d'épaisseur inférieure.

De toutes ces constatations, il dérive aussi une confirmation sur l'interprétation du mécanisme de filtration. En effet, étant donné que le calibre minimum des pores d'une bougie doit osciller entre $20 \times 20 - 15 \times 15 \mu$ pour qu'ils arrêtent les microbes, ces dimensions sont de beaucoup supérieures à celles de ces germes; par conséquent, le mécanisme d'arrêt doit être dû à l'adsorption des microbes aux parois des pore-canaux. En même temps, ce fait explique comment, après des périodes de temps diverses (ce phénomène se remarque plus facilement dans le cas des bactéries mobiles), les germes retenus peuvent se multiplier dans l'intérieur des pores avec le concours de facteurs adjuvants (présence de substratum nutritif, température, etc.) et, en vertu de leurs propres mouvements, peuvent parcourir toute la longueur du pore-canal et infecter le filtrat qui, jusqu'alors, avait été stérile. Enfin, la possibilité de toutes ces remarques indique comment la méthode proposée peut produire de véritables indices d'orientation pour les fabricants dans la création de types de bougies pour filtrations microbiennes, et sur les caractéristiques que celles-ci doivent posséder pour correspondre aux buts qu'elles se proposent.

RÉSUMÉ. — *On a étudié la structure intime des principaux types de bougies filtrantes d'usage courant dans les filtrations microbiennes avec une méthode simple et commode qui permet d'établir les données essentielles pour l'évaluation de la valeur des dits supports filtrants. Les caractéristiques nécessaires sont :*

1° *Pores avec calibres maxima non supérieurs à $28 \times 28 \mu$, mais il convient qu'ils oscillent entre $20 \times 20 \mu - 15 \times 15 \mu$.*

2° *Leur forme doit s'approcher autant que possible de la forme circulaire.*

3° *Leur nombre dans l'unité de surface prise comme standard ne doit pas dépasser 40-60, mais il convient qu'il oscille autour de 15-20-30.*

ÉTUDES BIOLOGIQUES
EFFECTUÉES GRACE AUX ULTRA-PRESSIONS :
RECHERCHES SUR LES MICROBES PATHOGÈNES
ET LEURS TOXINES, SUR LES VIRUS INVISIBLES,
LES BACTÉRIOPHAGES ET LES TUMEURS MALIGNES

par JAMES BASSET, MICHEL MACHEBOEUF et EUGÈNE WOLLMAN.

L'influence des pressions très élevées a depuis longtemps déjà intéressé les physiciens, les cristallographes et les chimistes, et diverses techniques avaient été proposées pour soumettre à de très hautes pressions des échantillons divers. Ces techniques étaient toutes de réalisation complexe et leur application à des buts biologiques n'était pas pratiquement possible. L'un de nous [1] a pu construire des presses hydrauliques permettant le travail en série jusqu'à 20.000 atmosphères et les conditions de travail avec ces presses sont telles qu'avec certains tours de main nous avons pu entreprendre des recherches biologiques dans des conditions rigoureuses d'asepsie.

Ces essais biologiques, poursuivis depuis 1930, ont déjà fait l'objet d'une série de notes préliminaires [2 à 13, 16] dont nous désirons rassembler ici les principales conclusions en y joignant quelques résultats nouvellement acquis.

Les faits que nous voulons présenter risqueraient de sembler disparates si nous ne rappelions pas tout d'abord quelles furent les considérations qui nous ont incités à entreprendre des essais biologiques aux ultra-pressions. On comprendra mieux ainsi, quel fut l'enchaînement de nos idées et comment nous fûmes amenés à constater et à rassembler ici une série de faits qui se rattachent à des domaines biologiques très divers.

Nous avons pensé que la vie n'était pas possible sous des pressions aussi énormes que celles que nous savions produire ; on pouvait donc espérer tuer, ou du moins atténuer les bac-

téries par pression et préparer ainsi des vaccins. On pouvait même espérer que la pression dénaturerait moins les antigènes microbiens que ne le font les autres agents généralement employés pour tuer les bactéries et préparer les vaccins (chaleur, antiseptiques, etc.). Si cet espoir avait été réalisé, on aurait pu préparer par pression des vaccins ayant conservé intacts les caractères antigéniques spécifiques des bactéries. Dès le début de nos essais, nous avons vu que les faits ne répondaient pas à un tel espoir [2 et 3] : les formes végétatives des bactéries sont bien tuées par une pression convenable, mais les bactéries tuées par pression ne sont pas actives comme vaccin, elles ont perdu leur spécificité vaccinnante en même temps que la vie. Diverses constatations faites au cours de ces essais furent cependant intéressantes à d'autres points de vue, ou tout au moins curieuses, elles ont été l'origine de toute la série d'essais biologiques que nous avons effectués.

Nous nous bornerons ici à l'exposé des recherches se rapportant aux agents pathogènes (bactéries, virus invisibles, toxines), aux tumeurs malignes et aussi aux agents de l'autolyse microbienne transmissible (bactériophages). Pour les autres essais sur des produits biologiques divers (diastases, protéides, anticorps, venins, etc.) déjà publiés [2, 3, 5, 6, 9], nous nous contenterons de rappeler très brièvement l'essentiel lorsque cela sera nécessaire pour la compréhension des faits et des considérations que nous présentons ici.

TECHNIQUE.

Nous ne décrirons pas ici les presses qui nous ont servi, leur description a fait l'objet de mémoires spéciaux [1] ; disons simplement que par le jeu de deux presses hydrauliques, dont la première sert à actionner le piston de la deuxième et grâce à des joints tout à fait particuliers et à des parois convenablement construites, on parvient à comprimer réversiblement un liquide dans une petite chambre de compression cylindrique (voir le schéma ci-joint). Dans le liquide contenu dans la chambre de compression, on peut au préalable faire baigner l'objet que l'on veut étudier. Cet objet, dans nos expériences biologiques, était toujours un liquide que nous devons con-

server à l'abri de toute souillure chimique ou bactérienne. Après divers essais, nous nous sommes tenus à la technique suivante : le liquide en expérience ne contenant strictement que la quantité d'oxygène qu'il avait dissoute par contact avec l'air à la pression atmosphérique était emprisonné aseptiquement entre deux ligatures dans un tube de gomme stérilisée (feuille anglaise). Aucune bulle d'air n'était emprisonnée avec

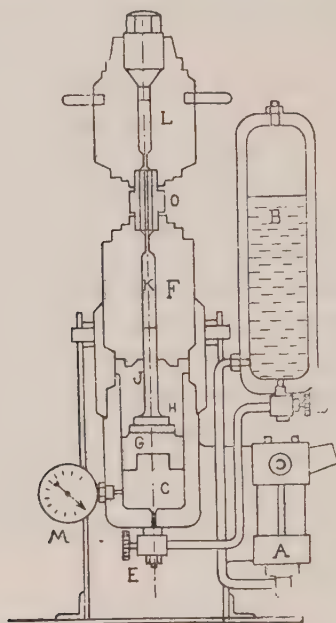


FIG. 1. — Principe de fonctionnement des appareils pour l'obtention d'ultra-pressions; A. Pompe à 1.000 kilogrammes par centimètre carré; B. Accumulateur; C. Pot de presse primaire; M. Manomètre; F. Pot à ultra-pressions; O. Tubulure de jonction; L. Chambre à expériences.

lui. Des tubes témoins identiques non soumis à la pression ont toujours été préparés et étudiés afin d'éliminer toute action possible du tube de gomme ou de l'emprisonnement temporaire du liquide étudié à l'abri de l'air. Ces tubes témoins subissaient exactement toutes les mêmes actions que les échantillons pressés, mais ils restaient à la pression atmosphérique. Les tubes qui devaient subir la pression étaient au contraire placés dans le liquide des presses hydrauliques et la pression se trans-

mettait évidemment intégralement au contenu des tubes à travers leur paroi molle (1).

Nous avons constaté que la *vitesse de compression* et la *vitesse de décompression* n'ont, en général, pas d'influence sensible sur le résultat obtenu par l'action des ultra-pressions sur les divers objets biologiques que nous avons étudiés. Pour fixer cependant ces facteurs, nous avons toujours mis trois minutes pour faire monter la pression et un temps égal, à la fin de l'expérience, pour faire retomber progressivement la pression jusqu'à la pression atmosphérique.

La durée pendant laquelle est maintenue la pression a une influence qui est, dans certains cas, assez nette mais toujours faible cependant; cette influence se fait surtout sentir lorsque l'on compare entre elles des compressions de durées assez brèves, aussi avons-nous toujours laissé les tubes en expérience pendant quarante-cinq minutes sous pression, sauf dans certains cas particuliers pour lesquels nous le spécifions.

ACTION DES ULTRA-PRESSIONS SUR LES BACTÉRIES (2).

Les bactéries non sporulées que nous avons étudiées (bacilles de Koch, *B. coli*, bacille typhique, pneumocoque, staphylocoque, etc.) résistent pendant quarante-cinq minutes à des pressions inférieures à 5.000 atmosphères, mais elle sont tuées si on les soumet à une pression supérieure. La limite de pression compatible avec la survie des germes non sporulés varie légèrement avec l'espèce bactérienne, mais se trouve toujours au voisinage de 6.000 atmosphères.

Les bactéries sporulées (*B. subtilis*, *B. tétanique*, *B. megathe-*

(1) Il est très important d'indiquer ici, qu'à aucun instant, dans nos expériences, la température de l'échantillon étudié ne différa de plus d'une fraction de degré centigrade de la température ambiante et, par conséquent, de la température des tubes témoins qui étaient toujours maintenus près des presses pendant que les échantillons pressés étaient dans celles-ci.

Il est d'ailleurs bien évident que la mise en pression d'un liquide en l'absence de toute phase gazeuse compressible ne peut pas dégager une quantité de chaleur appréciable; le liquide étant extrêmement peu compressible, le déplacement du point d'application de la force de compression est tellement faible que le travail est très petit et son équivalent calorique est bien incapable d'élever d'une manière appréciable la température des énormes masses métalliques qui constituent les parois des presses.

(2) J. BAS-ET et M. A. MACHEBOEUF [2].

rium, etc.) résistent, grâce à leurs spores, à toutes les ultra-pressions auxquelles nous avons pu les soumettre. (Nous avons fait monter la pression jusqu'à 20.000 atmosphères dans le cas du *B. subtilis*.)

ACTION DES ULTRA-PRESSIONS SUR LES DIASTASES (1).

Les diastases sont, comme on pouvait le penser, très résistantes aux ultra-pressions; elles résistent toutes à 9.000 atmosphères; cependant, elles sont atténuées par des pressions un peu plus élevées telles que 12.000 ou 13.000 atmosphères. Leur inactivation totale n'a lieu en général que pour des pressions extrêmement élevées, souvent supérieures à 13.000 atmosphères.

La pression inactivante varie d'ailleurs avec la diastase étudiée; elle varie légèrement aussi avec la nature du milieu dans lequel se trouve la diastase. Nous avons étudié un certain nombre de préparations diastasiques: sucrase, laccases, tryptase pancréatique, lipase pancréatique, catalase hépatique (2), amylase pancréatique, etc. La lipase pancréatique, particulièrement sensible à la pression, est complètement inactivée à 11.000 atmosphères en quarante-cinq minutes, tandis que la trypsine pancréatique, très résistante, n'est complètement inactivée que si la pression atteint 17.000 atmosphères.

ACTION SUR LES TOXINES MICROBIENNES (3).

Les toxines que nous avons étudiées (tétanique et diphtérique) sont influencées par les ultra-pressions exactement comme les diastases; aucune action des pressions inférieures à 10.000 atmosphères, atténuation par des pressions plus élevées (12.000 à 15.000 atmosphères) et inactivation totale seulement par des pressions énormes de l'ordre de 16.000 à 18.000 atmosphères. Ce fait tend, comme bien d'autres déjà, à rapprocher les toxines microbiennes des diastases.

(1) J. BASSET et M. A. MACHEBOEUF [2] et J. BASSET, M. LI-BONNE et M. A. MACHEBOEUF [5].

(2) Les essais sur la catalase hépatique, encore inédits, ont été effectués avec la collaboration de M^{me} G. Lévy.

(3) J. BASSET et M. MACHEBOEUF [2].

RECHERCHES SUR L'IMMUNITÉ EFFECTUÉES
GRÂCE AUX ULTRA-PRESSIONS.

Ainsi que nous le disions ci-dessus et contrairement à notre attente, les germes tués par les ultra-pressions ne sont pas des vaccins et ce fait est général aussi bien pour les bactéries que pour les toxines microbiennes : les ultra-pressions, en faisant perdre la vie aux bactéries ou l'activité aux toxines, font disparaître leur spécificité antigénique de vaccination ; les bactéries tuées ne sont pas devenues des vaccins, les toxines inactivées ne se comportent pas comme des anatoxines.

Ces faits curieux nous ont incités à étudier l'influence des ultra-pressions sur *les protéides* auxquelles les théories actuelles confèrent un rôle de tout premier plan dans les phénomènes de l'immunité (1).

Le sérum sanguin soumis à une pression très élevée (10.000 atmosphères) perd sa limpidité et sa fluidité, il devient une gelée très ferme, lactescente. Le caillot ainsi obtenu ne se rétracte pas et n'exsude pas comme un caillot sanguin. Si l'on broie ce caillot et si on le met en suspension dans de l'eau ou dans une solution saline diluée, certains protéides passent en solution, mais un abondant coagulum reste non dissous. Si l'on soumet le sérum à une pression moins élevée, 6.000 atmosphères environ, le sérum devient légèrement opalescent, mais il reste liquide et n'est pas coagulé ; sa viscosité est cependant nettement accrue. Si enfin la pression est inférieure à 4.500 ou 5.000 atmosphères, le sérum reste inchangé. Nous avons étudié séparément les globulines et les albumines du sérum après les avoir séparées grâce à du sulfate d'ammonium : les albumines ne paraissent pas modifiées, même si la pression s'élève aux plus hautes limites actuellement réalisables (19.000 atmosphères). Les globulines, au contraire, sont coagulées vers 7.000 atmosphères. C'est donc aux globulines que l'on doit attribuer les modifications présentées par le sérum sous l'influence des ultra-pressions. Si la pression est inférieure à 5.000 atmosphères, il est impossible de déceler une modification

(1) J. BASSET, M. MACHEBOEUF et G. SANDOR [6].

physico-chimique quelconque des albumines ou des globulines (pouvoir tampon, équilibre de membrane, iso-électrique, etc.). Pour les albumines, aucune modification n'est décelable, même si la pression est plus élevée. Pour les globulines, lorsque la pression n'est pas suffisante pour coaguler, mais suffisante pour que la viscosité s'accroisse, on ne constate encore aucune modification chimique décelable. Il semble que les ultra-pressions provoquent une simple modification dans l'état d'hydratation ou dans l'arrangement stérique des molécules protéidiques sans que se fasse en quantité décelable une hydrolyse ou une amidification ou toute autre cyclisation faisant intervenir des groupes acides ou basiques, car les courbes d'effet tampon, le point iso-électrique et l'activité dans les équilibres de membrane sont inchangés par les ultra-pressions. Ceci acquis, il était très intéressant de savoir si les ultra-pressions étaient capables de modifier la spécificité antigénique des protéides. Cette étude était d'autant plus intéressante que nous avons constaté que ni les bactéries tuées par pression, ni les toxines inactivées par pression ne constituaient des vaccins.

Au cours de cette étude, de très nombreux faits curieux se sont dévoilés : ils ont permis d'aboutir à des conclusions intéressantes sur certains points immunologiques (1).

1° Si l'on presse du sérum de cheval à moins de 4 500 atmosphères, il conserve toute sa spécificité antigénique : anaphylaxie, formation d'anticorps de fixation d'alexine, formation de précipitines.

2° Si l'on presse ce même sérum à plus de 5.000 atmosphères, il conserve encore intactes ses propriétés antigéniques pour la fixation et pour la précipitation, mais sa spécificité d'anaphylaxie est entièrement modifiée. Ce sérum pressé ne sensibilise plus le cobaye vis-à-vis du sérum de cheval non pressé, et il ne déclenche plus non plus de choc anaphylactique chez le cobaye sensibilisé avec du sérum de cheval normal.

3° Le sérum pressé à plus de 4.500 atmosphères a perdu sa spécificité anaphylactique originelle, mais il en a acquis une autre, la spécificité anaphylactique du sérum pressé, car il sen-

(1) Ces essais sur l'anaphylaxie et l'immunité ont été effectués en partie avec la collaboration de J.-J. Pérez [9] et en partie avec la collaboration de M^{lle} M. Faure.

sibilise l'animal vis-à-vis du sérum pressé à plus de 4.500 atmosphères.

Ces recherches immunologiques sont encore inachevées (1), mais une étude a déjà été faite sur le comportement aux pressions élevées de sérums d'animaux immunisés. Il a ainsi été constaté que les antitoxines diphtériques et tétaniques ne sont pas détruites, même lorsque la pression a été suffisante pour coaguler les globulines. Deux conclusions découlent de ce fait :

1° On admet assez généralement que les propriétés antitoxiques des sérums immuns sont liées à certaines fractions des globulines; nos expériences montrent que la dénaturation des globulines par ultra-pression ne fait pas disparaître l'activité antitoxique. Cette activité serait donc liée à des fonctions différentes de celles touchées par la pression.

2° Fait plus intéressant encore peut-être du point de vue pratique : en pressant vers 5 ou 6.000 atmosphères des sérums thérapeutiques, on ne les coagule pas, on ne leur fait pas perdre leur pouvoir antitoxique, et cependant on modifie complètement leur spécificité anaphylactique. Ces sérums pressés ne sont plus capables de déclencher un choc anaphylactique chez des animaux ayant reçu une injection antérieure d'un sérum thérapeutique ordinaire. Des sérums thérapeutiques pressés sont peut-être utilisables en pratique pour éviter les accidents chez les patients ayant déjà reçu autrefois une injection de sérum thérapeutique. Notons d'ailleurs que, si un individu devait une troisième fois dans sa vie avoir recours à la sérothérapie, l'utilisation du sérum pressé n'aurait plus d'avantage sur le sérum ordinaire, car le sérum pressé sensibilise vis-à-vis du sérum pressé, tout comme le sérum ordinaire sensibilise vis-à-vis du sérum ordinaire.

Les résultats que nous venons de résumer permettent de conclure que les pressions très élevées sont des agents physiques extrêmement actifs sur les organismes vivants et sur divers produits biologiques. Comme d'autres agents physiques déjà étudiés, chaleur, radiations diverses, etc., les pressions peuvent détruire les micro-organismes et les cellules des êtres supé-

(1) Cette série de recherches, sur lesquelles nous ne nous étendrons pas ici, est poursuivie par Machebœuf, Basset et J.-J. Pérez.

rieurs; elles peuvent également modifier certains protéides et inactiver les diastases et les toxines microbiennes.

Parmi les données apportées par ces premières recherches sur les effets biologiques des ultrapressions, l'une, en particulier, méritait de retenir notre attention : c'était le fait que la sensibilité à la pression ne variait que dans des limites assez étroites pour les objets d'une même catégorie et pouvait, par conséquent, dans une certaine mesure, servir à les caractériser.

Il était donc intéressant d'étendre ces recherches à des agents dont la nature est encore discutée, tels les ultravirus et les bactériophages, les principes en jeu dans les tumeurs « filtrables » et, enfin, aux tumeurs de greffe.

I. — Études sur les ultravirus ou virus filtrables (virus des auteurs anglais).

Les agents constituant ce groupe sont considérés par la majorité des bactériologistes comme des micro-organismes authentiques, c'est-à-dire des éléments vivants autonomes ne différant des agents pathogènes visibles que par leurs dimensions plus réduites; ce seraient des « inframicrobes » (Nicolle). Cette façon de voir semble se vérifier pour les agents de la variolo-vaccine, de la variole aviaire, etc., agents qui paraissent être représentés par certains éléments qu'on parvient à mettre en évidence par des méthodes particulières de coloration (Borre, Paschen). Les recherches récentes montrent que ces *Borreliota* (Goodpasture) se placent à la limite de la visibilité et peuvent être photographiés en lumière ultraviolette : ces agents perdent, du reste, de ce fait, leur droit au titre de virus *invisibles*.

La notion des inframicrobes s'applique encore, sans doute possible, aux agents proprement invisibles de très nombreux processus infectieux.

Il paraît en être autrement pour les facteurs de certains processus attribués d'habitude également aux ultravirus : les agents de certaines mosaïques des plantes, ceux des tumeurs filtrables, les agents d'autres processus encore, présentent des particularités qui ont conduit à douter qu'il s'agisse d'« inframicrobes » authentiques. Se basant sur des faits relatifs à la bactériophagie,

l'un de nous [14] soutient depuis de nombreuses années, que parmi les processus attribués aux ultravirus, il y a lieu de distinguer, à côté des processus à inframicrobes proprement dits, des processus dont les agents sont des éléments d'origine cellulaire et se comportent comme les supports matériels de certains caractères cellulaires. Une façon de voir analogue a été soutenue récemment par Rivers.

D'autres auteurs rapprochent les agents de tels processus infectieux de produits cellulaires : *diastases*, toxines ou hormones. Ainsi pour Doerr, les bactériophages des bactéries seraient des *hormones de croissance* (Wuchshormone). Pour E. Fraenkel, les principes actifs dans les mosaïques des plantes, dans le sarcome de Rous, dans la fièvre aphteuse, seraient des « virus-enzymes ».

Étant donné la résistance très différente à l'action des hautes pressions de micro-organismes authentiques (bactéries) d'une part, et des diastases ou toxines de l'autre, il était naturel de rechercher le comportement, à cet égard, d'un certain nombre d'ultravirus.

1° VACCINE [4]. — Les expériences ont été faites avec un virus particulièrement actif isolé par M. Bardach (virulence pour le lapin : 1 p. 5.000.000). Ce virus a résisté à la pression de 1.800 atmosphères pendant quarante-cinq minutes (inoculation positive à 1 p. 100.000). Il fut inactivé par une exposition de même durée à 4.500 atmosphères.

Dans les expériences qui suivent, faites par J. Basset, S. Nicolau et M. Machebœuf [12], la durée d'exposition à la pression a été de trente minutes.

2° VIRUS RABIQUE FIXE (souche de l'Institut Pasteur). — Ce virus a résisté à la pression de 3.000 atmosphères. Il fut atténué par 4.000 et inactivé par 5.000 atmosphères.

3° VIRUS HERPÉTIQUE. — Résistant aux pressions de 1.000 et 2.000 atmosphères, ce virus est inactivé à 3.000 atmosphères.

4° VIRUS AMARIL. — Le virus de la fièvre jaune résiste à 1.000 atmosphères : les singes (*M. rhesus*) inoculés avec le

virus témoin ou avec le virus ainsi traité ont succombé en huit et neuf jours respectivement. Ce virus est atténué aux pressions de 2 000 et 3.000 atmosphères : mort des animaux en quinze jours (les expériences à plus haute pression n'ont pas encore été effectuées dans ce cas).

5° VIRUS APHTEUX. — Soumis à la pression de 2.000 atmosphères, le liquide de vésicules plantaires de cobaye dilué à 1 p. 50 garde son activité. Celle-ci est atténuée à 3.000 et détruite à 4.000 atmosphères.

6° VIRUS ENCÉPHALO-MYÉLITIQUE. — Le virus de la maladie de Borna est le plus résistant des virus étudiés. Il n'est inactivé qu'à 6.500 atmosphères.

7° VIRUS DE LA PESTE AVIAIRE (1). — Ce virus est détruit en trente minutes par une pression de 4.000 atmosphères; il résiste, par contre, à plus de 2.000 atmosphères.

Ces résultats montrent que la sensibilité à la pression ne dépend pas des dimensions des éléments actifs : elle est sensiblement la même pour le virus aphteux dont les éléments ont un diamètre de 8 à 12 μ (Elford et Galloway) que pour l'un des plus gros des virus filtrables étudiés, celui de la vaccine (175 μ) ; par contre, elle peut différer de façon marquée pour des virus dont les éléments ont des dimensions sensiblement pareilles (virus herpétique, virus vaccinal, virus encéphalo-myélitique). Mais si la sensibilité à la pression varie dans certaines limites d'un virus à l'autre, tous les virus étudiés jusqu'ici se comportent comme des éléments relativement labiles, leur sensibilité étant, dans l'ensemble, du même ordre, et même plus grande, que celle des formes végétatives des bactéries. La résistance des virus à la pression est, en tout état de cause, très inférieure à celle des diastases et des toxines dont certains chercheurs, nous l'avons vu, ont voulu les rapprocher.

(1) Les essais sur la peste aviaire ont été effectués par P. Lépine, J. Basset et M. Macheboeuf [13].

POUVOIR ANTIGÈNE DES VIRUS INACTIVÉS PAR PRESSION.
TENTATIVES INFRUCTUEUSES DE VACCINATION
PAR DES VIRUS ULTRA-PRESSÉS.

Avec le virus de l'herpès [42] et avec celui de la peste aviaire [43], des essais ont été effectués pour savoir s'il n'était pas possible de vacciner les animaux en leur injectant des virus inactivés par pression. Des tentatives analogues avaient échoué, nous l'avons vu, dans le cas des bactéries, mais ces bactéries, pour mourir, doivent subir une pression assez élevée voisine de 6.000 atmosphères et nous savons que certains protéides sont modifiés par des pressions de cet ordre. Nous avions espéré que dans le cas des virus les plus sensibles à la pression, inactivés dès 3.000 ou 4 000 atmosphères, les protéides ne seraient pas modifiés et les propriétés antigéniques seraient conservées. Il n'en est rien, même avec le virus de l'herpès qui est inactivé à 3.000 atmosphères, il est impossible de préparer par pression un vaccin actif : aucune immunité acquise ne se manifeste chez les animaux inoculés avec le virus inactivé par pression. Ce fait est curieux, car pour les divers protéides que nous avons étudiés (sérum, blanc d'œuf), nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification physique, ni chimique, ni immunologique sous l'influence de pressions aussi basses que 3.000 ou 4.000 atmosphères.

II. — Études sur les bactériophages.

On sait les controverses suscitées par la nature de ces principes. Suivant qu'on s'attache aux faits qui incitent à y voir des éléments vivants autonomes ou à ceux qui paraissent en établir l'origine cellulaire, endogène, les uns y voient des ultravirus authentiques, c'est-à-dire des inframicrobes parasites des bactéries, alors que pour d'autres il s'agit de produits de sécrétion bactérienne tels que les diastases (autolysines). La conception développée par l'un de nous permet de concilier les données sur l'autonomie des bactériophages avec leur origine cellulaire probable. Dans cette conception les bactériophages seraient des

éléments supports de certains caractères cellulaires; ce seraient des *facteurs* au sens des généticiens [14].

L'épreuve des ultrapressions paraissait devoir fournir, ici encore, des indications intéressantes et, notamment, aider à départager les partisans des théories diastasiques et ceux pour qui les bactériophages seraient des éléments vivants (virus, facteurs lysogènes).

Les expériences ont porté sur les bactériophages du *staphylocoque*, du *B. typhique*, du *B. subtilis* [4] et du *B. megatherium* [4 et 10]. Comme on pouvait s'y attendre, le bactériophage staphylococcique plus labile que les autres (chaleur, conservation) s'est montré être aussi le plus sensible à l'action de la pression. C'est ainsi que le titre lytique d'un bactériophage staphylococcique est descendu de 10^{-8} à 10^{-6} après 30' à 1.000 atmosphères. L'inactivation n'est complète qu'au-dessus de 3.500 atmosphères (1).

Le bactériophage staphylococcique se montre par conséquent plus sensible à la pression que le staphylocoque lui-même (5.000-6.000 atmosphères). Il y a là un fait intéressant et qui fournit, dans ce cas particulier, une méthode permettant de purifier (ultrapurifier, d'Hérelle) des cultures de staphylocoque qui contiennent des facteurs lysogènes.

Le bactériophage du *B. typhique*, celui du *B. megatherium* et celui du *B. subtilis* se montrent plus résistants à la pression. Ils restent actifs après avoir été comprimés à 2.000 et même à 4.500 atmosphères, la destruction n'étant totale que vers 500 atmosphères.

Les bactériophages se comportent donc, au point de vue de la

(1) Les premières expériences sur les bactériophages avaient été faites à l'aide d'une presse dont les indications n'étaient valables qu'à 500 atmosphères près. Peu important tant qu'il s'agissait de pressions très élevées, l'écart devenait sensible pour la valeur de 2.000 atmosphères qui avait paru inactiver le bactériophage staphylococcique. Nous avons donc repris les expériences sur ce dernier avec une presse de précision, utilisable jusqu'à 3.500 atmosphères et qui a servi, également, dans les essais sur les tumeurs.

Ces nouvelles expériences sur le bactériophage staphylococcique ont donné les résultats suivants : Ce bactériophage est atténué aux pressions de 1.500 et 1.800 atmosphères (45') mais fournit encore des plages par étalement direct sur gélose. A partir de 2.000 atmosphères, il ne donne plus de plages par étalement direct, mais la lyse peut encore se faire en bouillon avec du bactériophage pressé à 2.500 et même à 3.000 atmosphères. Inconstante à 3.500 atmosphères, sa destruction est définitive vers 5.000 atmosphères.

sensibilité à la pression, d'une façon tout à fait superposable à celle des ultravirus que nous avons étudiés. Dans les deux cas il s'agit d'éléments relativement labiles. A l'encontre des bactériophages, les autolysines bactériennes spécifiques gardent une partie de leur activité même au delà de 7.500 atmosphères et se comportent donc, sous ce rapport, comme des diastases [10].

Lorsque la pression porte, non plus sur des bactériophages libres, mais sur des facteurs lysogènes contenus dans les spores, les résultats sont tout différents. Qu'il s'agisse de spores de bactéries spontanément lysogènes ou de spores de bactéries sensibles expérimentalement « contaminées » par le bactériophage correspondant, la résistance des bactériophages inclus dans les spores devient, semble-t-il, aussi grande que celle des spores elles-mêmes (activité encore conservée à la pression de 13.500 atmosphères dans le cas de spores de *B. subtilis*). Du fait d'être inclus dans les spores, les bactériophages sont protégés efficacement contre les actions nocives (chaleur, pression) [10].

III. — Recherches sur les néoplasmes.

Nous avons étudié l'action de la pression sur une tumeur de poule, le sarcome de Rous, transmissible par filtrats exempts de cellules. Nous avons également étudié des tumeurs de souris transmissibles seulement par greffe, ainsi qu'une tumeur de greffe du lapin (Brown-Pearce) et une tumeur filtrable du même animal (papillome de Shope).

SARCOME « FILTRABLE » DES POULES. — Le problème, quant à la nature de l'agent des tumeurs filtrables des oiseaux (on en connaît actuellement de nombreux types), se pose dans les mêmes termes que pour les bactériophages que nous venons d'étudier : s'agit-il de principes autonomes (virus, éléments d'origine cellulaire) ou bien de produits cellulaires assimilables à des diastases ou à des toxines ?

Des échantillons de pulpe néoplasique en suspension dans de l'eau physiologique furent soumis à diverses pressions (1.800, 4.000 et 6.000 atmosphères) pendant trente minutes.

Les poules témoins (inoculées avec la suspension non pressée) ainsi que les poules inoculées avec la suspension portée à 1.800 atmosphères, contractèrent des tumeurs; ces dernières, du reste, avec un certain retard (1).

Les poules inoculées avec la pulpe portée à 4.000 et 6.000 atmosphères n'ont pas contracté de tumeur. Ces poules, d'ailleurs, ne présentèrent pas d'immunité à l'inoculation ultérieure de pulpe active.

On voit, par ces résultats, que l'agent du sarcome de Rous présente à la pression une sensibilité exactement comparable à celle de certains bactériophages et de certains virus.

Il ne saurait être question de l'assimiler à une diastase comme celles dont nous avons montré la grande résistance aux ultra-pressions.

TUMEURS DE SOURIS.

La transmission de ces tumeurs n'est réalisable que par greffe. Le caractère « néoplasme » semble lié à une modification des cellules mêmes de l'organisme, et l'hypothèse d'un virus cancérigène ne compte plus, pour ces tumeurs de greffe, que de rares partisans.

Nous avons recherché la résistance à la pression de 4 tumeurs de souris. Les expériences ont porté sur un carcinome (63 de Londres), 2 sarcomes (37 de Londres et sarcome d'Ehrlich) ainsi que sur une tumeur spontanée du poumon dont la nature histologique n'a pas été précisée (remise par M^{me} V. Henri). Dans une première série d'expériences, les suspensions de tumeur dans l'eau physiologique furent portées aux pressions de 1.800, 4.000 et 6.000 atmosphères; 6 souris furent inoculées avec chaque échantillon pressé. La plus basse des pressions employées ayant suffi à empêcher la transmission de toutes les tumeurs, une seconde expérience fut instituée avec le sarcome 37 seulement. Les suspensions de cette tumeur furent portées aux pressions de 1.000 à 1.800 atmosphères.

Comme dans l'expérience précédente, l'échantillon porté à 1.800 atmosphères a perdu la propriété de produire une tumeur

(1) Mort, respectivement en dix-sept et dix-neuf jours pour les témoins, en quarante-quatre et cinquante-deux jours pour les poules inoculées avec la pulpe pressée à 1.800 atmosphères.

par inoculation; seules les souris inoculées avec la suspension témoin ainsi que celles que reçurent la suspension portée à 1.000 atmosphères, contractèrent des tumeurs [11].

Enfin, nous avons pu comparer le comportement à la pression de deux tumeurs du lapin, dont l'une, le cancer de Brown-



FIG. 2 — A droite, tumeur intraoculaire produite par une suspension de l'épithéliome Brown-Pearce, pressée à 1.000 atmosphères; à gauche, œil resté indemne après inoculation de suspension pressée à 1.800 atmosphères.

Pearce, est une tumeur de greffe, et l'autre, le papillome de Shope, est liée à un agent filtrable (1).

(1) Il semblait y avoir entre les tumeurs « filtrables » et les tumeurs « de greffe » un fossé infranchissable. L'hypothèse émise par l'un de nous suivant laquelle le caractère *néoplasme* serait lié à des éléments cellulaires de stabilité plus grande pour les tumeurs filtrables permettrait de combler ce fossé. Les données récentes sur les verrues transmissibles par filtrat chez le lapin sauvage et ne donnant, dans la plupart des cas, chez le lapin domestique, que des tumeurs de greffe (ou plutôt d'autogreffe), paraissent fournir un appui à cette façon de voir.

Des expériences faites en collaboration avec M. Bardach montrent que la première de ces tumeurs résiste à 1.000 atmosphères, mais se trouve inactivée à 1.800. Le papillome de Shope résiste à la pression de 2.000 et de 4.000 atmosphères pour être inactivé à 6.000 seulement [16].

La tumeur de greffe de lapin et celles de souris se sont donc montrées plus sensibles à la pression que les divers agents étudiés jusqu'ici et il paraissait probable que cette sensibilité était l'expression de celle des cellules néoplasiques elles-mêmes.

Des expériences instituées sur des cultures de tissus ont confirmé cette façon de voir. Ce travail, effectué en collaboration par J. A. Thomas, M. A. Machebœuf et J. Basset est encore inédit. Nous nous contenterons de donner ici un bref résumé de quelques-uns des résultats obtenus :

Des cœurs entiers d'embryons de poulets furent placés dans du liquide de Tyrode, puis soumis pendant trente minutes à des pressions diverses, mais toujours à la température ordinaire. Des cultures en gouttes pendantes furent ensuite pratiquées avec des fragments de ces cœurs ou des fragments d'aorte.

Une pression de 1.000 ou de 1.500 atmosphères est absolument sans effet sur les cœurs dont les cultures évoluent exactement comme celles des cœurs témoins qui furent simplement soumis à toutes les mêmes manipulations, mais à la pression atmosphérique.

Lorsque la pression atteint 1.800 atmosphères, les cultures sont au contraire négatives.

En somme, la résistance des cellules normales du cœur et de l'aorte du poulet est comparable à celle des cellules néoplasiques que nous avons étudiées.

Résumé et rappel des conclusions.

Les pressions très élevées sont des agents physiques extrêmement actifs sur les organismes vivants et sur de nombreux produits biologiques, elles sont facilement applicables avec précision grâce aux presses hydrauliques spéciales de James Basset.

Comme d'autres agents physiques déjà étudiés, chaleur, radiations diverses, etc., les pressions peuvent détruire les

micro-organismes et les cellules des animaux supérieurs; elles peuvent également modifier certains protéides et inactiver les diastases et les toxines microbiennes. La sensibilité à la pression des divers objets biologiques étudiés ne varie que dans des limites assez étroites pour les objets d'une même catégorie; cette sensibilité peut par conséquent contribuer, dans une certaine mesure, à classer certains objets de nature encore discutée.

On peut écrire la liste suivante qui indique les résistances aux ultra-pressions des diverses catégories d'objets biologiques que nous avons étudiées.

1° Les cellules des animaux supérieurs et les cellules néoplasiques sont tuées par des pressions assez peu élevées de l'ordre de 1.800 atmosphères.

2° Les *virus invisibles* résistent à 1.000 et à 2.000 atmosphères mais sont inactivés par des pressions plus élevées généralement inférieures à 5.000 atmosphères; seul le virus de la maladie de Borna a résisté au-delà de 6.000 atmosphères (destruction à 6.500).

3° Les bactériophages étudiés, comme les virus invisibles, résistent tous à 1.000 et à 2.000 atmosphères, et aucun ne résiste à 6.000-6.500 atmosphères.

4° Les *bactéries non sporulées* résistent à des pressions déjà élevées de 4.000 à 5.000 atmosphères, mais sont tuées si la pression s'élève vers 6.000 atmosphères.

5° Les protéides que nous avons étudiés de ce point de vue ne sont pas dénaturés d'une façon appréciable si on les soumet à des pressions ne dépassant pas 7.000 atmosphères. Par des pressions supérieures, les globulines du sérum sanguin ou du blanc d'œuf sont coagulées irréversiblement. Les albumines, au contraire, ne présentent pas de modification apparente lorsqu'on les soumet à des pressions beaucoup plus élevées.

6° Les *diastases et les toxines microbiennes* ne sont pas modifiées par les pressions inférieures à 9.000 atmosphères; elles sont atténuées par des pressions très élevées comprises entre 10.000 et 15.000 atmosphères; elles sont enfin inactivées si la pression est suffisante. La pression nécessaire pour inactiver complètement certaines diastases et certaines toxines est énorme et voisine de 19.000 atmosphères;

7° *Les spores bactériennes* sont les éléments vivants les plus résistants, et nous n'avons pas pu tuer celles que nous avons étudiées, même en les soumettant à 20.000 atmosphères (*B. subtilis*).

Les résultats fournis par les expériences à l'aide des ultra-pressions permettraient donc d'aiguiller les recherches lorsqu'on cherche à préciser la nature d'un phénomène biologique ou pathologique.

Les toxines microbiennes sont ainsi, par les ultra-pressions, rapprochées, une fois de plus, des diastases.

Les agents de la lyse microbienne transmissible (bactériophages) ne paraissent pas pouvoir être assimilés à des diastases présentes dans les filtrats microbiens actifs, car les facteurs lysogènes sont beaucoup plus sensibles aux ultra-pressions que toutes les diastases étudiées; cette sensibilité est, par ailleurs, comparable à celle des virus invisibles.

Les cancers de greffe ne sont plus transmissibles lorsque le greffon a été soumis à une ultra-pression très faible (1.800 atmosphères) qui serait incapable d'inactiver l'un quelconque des microbes ou des virus invisibles que nous avons étudiés. Ce fait n'est pas en faveur de l'hypothèse qui admet comme agent causal de ces cancers un virus invisible. Le sarcome de Rous de la poule, comme le papillome de Shope du lapin, qui sont liés à des agents filtrables, sont, contrairement aux autres néoplasmes que nous avons étudiés, encore transmissibles par des greffons pressés à 2.000 atmosphères (sarcome de Rous) et même 4.000 atmosphères (papillome du lapin). Ces tumeurs ne sont plus transmissibles lorsque les pressions sont supérieures et atteignent, par conséquent, celles qui détruisent certains virus invisibles et certains bactériophages.

Quelques études sur l'immunité nous ont en outre montré que la spécificité antigénique des bactéries, des virus invisibles et des toxines microbiennes était détruite par les ultra-pressions, si bien qu'il n'est pas possible de préparer des vaccins en inactivant simplement les bactéries, les virus ou les toxines par action des ultra-pressions.

La spécificité anaphylactique d'un sérum est modifiée par pression (4.500 atmosphères). Les antitoxines contenues dans un sérum antitoxique ne sont pas atténuées par des pressions

même notablement supérieures à celles nécessaires pour modifier la spécificité anaphylactique du sérum, si bien que l'on peut penser à l'utilisation de sérums thérapeutiques pressés pour éviter des accidents anaphylactiques lors d'une deuxième application de la sérothérapie à un malade sensibilisé par une injection ancienne de sérum.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JAMES BASSET. *C. R. Acad. des Sciences* **185**, 1927, p. 343 ; **191**, 1930, p. 1923, et **195**, 1932, p. 1242.
- [2] J. BASSET et M. A. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. des Sciences*, **195**, 1932, p. 1431.
- [3] J. BASSET et M. A. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. des Sciences*, **196**, 1933, p. 67.
- [4] J. BASSET, M^{me} E. WOLLMAN, M. A. MACHEBOEUF et M. BARDACH. *C. R. Acad. des Sciences*, **196**, 1933, p. 1138.
- [5] J. BASSET, M. LISBONNE et M. A. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. des Sciences*, **196**, 1933, p. 1540.
- [6] J. BASSET, M. A. MACHEBOEUF et G. SANDOR. *C. R. Acad. des Sciences* **197**, 1933, p. 796.
- [7] J. BASSET, M. A. MACHEBOEUF et M^{me} G. LÉVY. *Archives Internat. de Physiol. et Physico-chimie biologique*, 1933, p. 713 à 722, et *Bulletin de la Société Philomathique*, 1933, p. 757 à 788.
- [8] J. BASSET et M. A. MACHEBOEUF. Die Wirkung sehr hoher Drucke auf Enzyme. *Ergebnisse der Enzymforschung*, Leipzig, **3**, 1934, p. 304.
- [9] J. BASSET, M. A. MACHEBOEUF et J. J. PEREZ. *C. R. Acad. des Sciences*, **200**, 1935, p. 496.
- [10] J. BASSET, E. WOLLMAN, M^{me} E. WOLLMAN et M. A. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. des Sciences*, **200**, 1935, p. 1072.
- [11] J. BASSET, E. WOLLMAN, M. A. MACHEBOEUF et M. BARDACH. *C. R. Acad. des Sciences*, **200**, 1935, p. 1247.
- [12] J. BASSET, S. NICOLAU et M. A. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. des Sciences*, **200**, 1935, p. 1882.
- [13] P. LÉPINE, J. BASSET et M. A. MACHEBOEUF. *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, 1936, p. 202.
- [14] E. WOLLMAN. *Annales de l'Institut Pasteur*, **39**, 1925 ; **41**, 1927 ; **43**, 1929 ; ainsi que *Bull. Inst. Pasteur* **26**, 1928, et **32**, 1934.
- [15] M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **18**, 1936, p. 1181-1191.
- [16] E. WOLLMAN, M. MACHEBOEUF, M. BARDACH et J. BASSET. *C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 000.

LES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES DUES AUX EUGLOBULINES

par V. CHORINE.

I

LA RÉACTION DE HENRY

La réaction proposée par Henry [51], en 1927, pour le diagnostic du paludisme est à l'heure présente bien connue et partout acceptée. Elle est basée sur la propriété que possède le sérum paludéen de flocculer en présence de mélanine en milieu de faible concentration moléculaire. La mélanine s'extrait de la choroïde des yeux de bœuf dilacérée dans l'eau distillée et additionnée de formol du commerce à raison de 1 p. 200. Une fois débarrassée par centrifugation de tous débris de tissus, l'opacité de la suspension est ramenée à un titre tel que, diluée à 1 p. 10 dans l'eau distillée, elle marque 48°-49° au photomètre de V. B. Y. Enfin, pour l'usage, on titre sur sérum paludéen la suspension de mélanine par rapport à un échantillon connu.

On dilue la mélanine au dixième dans deux tubes contenant l'un de l'eau distillée, l'autre de l'eau salée à 3 p. 1.000. A 1 cent. cube de chaque dilution de mélanine, on ajoute 0 c. c. 2 du sérum à examiner. On utilise en même temps deux tubes témoins contenant l'un de l'eau distillée, l'autre de l'eau salée, formolés au même titre. Henry alcalinise l'eau distillée et l'eau salée qu'il emploie par la soude $\frac{N}{400}$ à raison de 0 c. c. 25 p. 100 cent. cubes. Cette alcalinisation est tout illusoire, car le CO_2 de l'air neutralise une telle proportion de soude en quelques heures. D'ailleurs cette technique s'est montrée insuffisante dans certains cas ; Henry a été obligé de la modifier à plusieurs reprises.

Les réactions positives se manifestent par une floculation plus ou moins abondante de la mélanine. Souvent le tube témoin à l'eau distillée flocule aussi, mais ordinairement moins que le sérum additionné de mélanine. Dans ce cas, on ne lit que les tubes préparés avec l'eau salée dont le témoin, sauf dans quelques cas très rares, reste clair.

NATURE DE LA RÉACTION.

THÉORIE DE HENRY [51]. — Quand Henry imagina sa réaction, il partit de cette idée que le pigment mélanique que l'on trouve dans l'organisme des paludéens joue le rôle d'antigène et amène la formation d'anticorps qui précipiteraient la mélanine. Le Bourdellès a beaucoup contribué à développer cette théorie.

I. — Les anticorps ne sont pas en jeu dans la réaction.

Quand nous avons commencé nos études sur la réaction, nous avons accepté l'idée de Henry sur la nature spécifique de la réaction, mais nous avons dû très vite l'abandonner.

1° La mélanine ne possède de propriété antigène que chez les albinos. En collaboration avec Gillier [25], nous avons inoculé des lapins de pelage coloré avec une suspension de mélanine provenant des yeux de bœuf ou du sarcome mélanique du cheval, celle-ci convenant d'ailleurs aussi bien que l'autre pour la réaction de Henry. Après une dizaine d'injections intraveineuses chez des lapins, péritonéales chez des lapins et des cobayes, la réaction se montra constamment négative. Greig, van Rooyen et Hendry [50] ont confirmé nos expériences à cet égard.

La mélanine ne possède donc pas de propriété antigène. Kritchevsky et Rubinstein [54] ont voulu lui attribuer un rôle d'haptène dont ils auraient vérifié la réalité après préparation de lapins et d'oiseaux (linottes et serins) avec un mélange de sérum de porc et de mélanine. Nous avons vainement répété les expériences de Kritchevsky et Rubinstein sans réussir à les confirmer.

Adant [2] a obtenu une sensibilisatrice spécifique en se servant de lapins albinos, observation indiquant que la mélanine devient antigène quand elle manque chez les animaux d'expérience.

D'ailleurs, le pigment paludéen diffère absolument de la mélanine. Il provient de l'attaque par le parasite de la molécule d'hémoglobine, tandis que la mélanine dérive de substances protéiques, même non chromogènes. Il ne peut donc exister aucun rapport immunologique entre ces deux substances.

Trensz [94], même avec l'hémozoïne extraite de la rate et du foie de paludéens morts d'accès pernicieux, n'a pas pu provoquer l'apparition d'anticorps.

S'il fallait d'autres faits pour confirmer la non-spécificité de la réaction, nous n'aurions pas de peine à en fournir.

2° En collaboration avec M^{lle} Koechlin [29] nous avons constaté que la réaction de Henry varie de jour en jour pour un même sérum séparé du caillot, tandis que le maintien du sérum sur le caillot stabilise relativement les propriétés de celui-ci dont l'activité floculante s'atténue lentement et progressivement. La lecture des chiffres d'opacité au photomètre V. B. Y. pour un sérum normal suit d'ailleurs une courbe identique, mais d'amplitude moindre.

3° Les anticorps exigent un certain temps pour se former. Or, nous avons constaté [24] que la réaction à la mélanine apparaît chez les paralytiques généraux trois à sept jours après l'impaludation par injection de sang palustre, souvent même avant le premier accès. Des constatations analogues ont été faites par Alcay, Cottoir et Marill, en Algérie [4].

4° Il convient surtout de faire ressortir l'inhibition de la réaction par les sels neutres à une concentration bien inférieure à celle qui inhibe l'action des anticorps. La réaction de Henry ne se produit que dans l'eau distillée ou les solutions salines faibles; elle est entravée dès que la concentration moléculaire dépasse 3 à 4 grammes de NaCl par litre. Malgré toute les modifications de technique apportées soit par Henry, soit par d'autres auteurs, on n'a pas réussi à reproduire la floculation d'un sérum palustre par la mélanine dans un milieu isotonique, sans utiliser des produits chimiques précipitants les globulines.

Nous pourrions ajouter à ces arguments d'autres encore qui nous sont fournis par des expériences que nous exposerons plus loin et dont les résultats ne sont pas d'accord avec la spécificité de la réaction de Henry. Ici, nous n'en avons relaté que quelques-uns qui nous paraissent suffire à démontrer que les anticorps spécifiques ne sont pas en jeu dans la réaction de Henry.

II. — Réaction de Henry et floculation dans l'eau distillée.

Henry a remarqué que les sérums de paludéens sont souvent instables dans l'eau distillée et y flocculent parfois en dilution à 1 p. 5. Comme la mélanofloculation est faite dans des solutions hypotoniques, il utilise pour la réaction des solutions salines de 0,5 à 3 p. 1.000 de NaCl qui n'ont pas le même inconvénient. Le parallélisme de ces deux floculations a frappé plusieurs observateurs et Trensztz suppose qu'il existe entre elles un lien de parenté [89]. Nous avons étudié de plus près le rapport qui existe entre ces deux phénomènes.

Pour ces expériences, nous avons pris un sérum de paludéen très positif à la mélanine et nous avons pratiqué une série de réactions dans des solutions de plus en plus concentrées en NaCl. La première réaction a été faite en eau distillée et les autres dans l'eau salée, la deuxième à 1 p. 1.000, la troisième à 2 p. 1.000, la quatrième à 3 p. 1.000, etc., jusqu'à 10 p. 1.000. Le graphique suivant exprime les résultats obtenus. L'expérience répétée avec de nombreux sérums s'est comportée de même.

En examinant les courbes, on constate, que le sérum floccule dans l'eau distillée ou salée sans être additionné de mélanine et que les deux floculations suivent la même marche. Mais la floculation à la mélanine est toujours plus marquée que la floculation dans l'eau pure à la même concentration. La raison en est que la mélanine, dont la masse s'associe à la floculation préexistante, la rend plus apparente. Si nous désignons la floculation à la mélanine par la lettre A et la floculation dans l'eau distillée par la lettre B, nous constatons que l'écartement de ces deux lignes va en diminuant, mais jusqu'à un

certain point seulement. La floculation dans l'eau distillée décroît d'intensité progressivement avec l'augmentation de la concentration moléculaire et les flocons deviennent de plus en plus petits. Chacun d'eux retenant de moins en moins de mélanine, les deux réactions se rapprochent lentement comme intensité et les courbes deviennent parallèles. Ce parallélisme

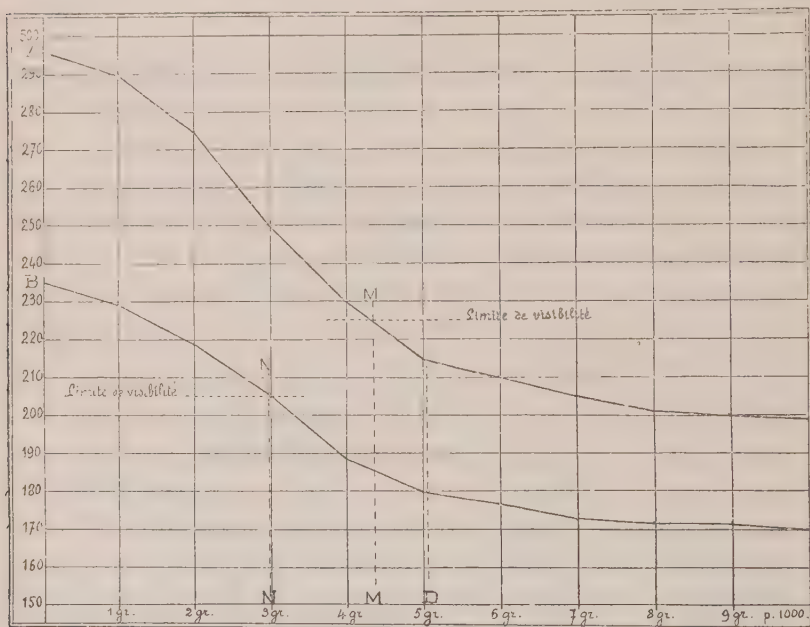


FIG. 1. — La courbe supérieure A représente la floculation du sérum dans l'eau salée additionnée de mélanine; la courbe inférieure B, la floculation dans le même solvant sans mélanine. En ordonnées, nous avons porté le degré photométrique; en abscisses, la concentration de la solution en NaCl. Sur les deux courbes nous avons marqué deux points M et N, limite inférieure de la floculation appréciable macroscopiquement. Nos deux courbes ne peuvent être correctement établies que si la floculation dans l'eau distillée n'est pas très forte parce qu'alors l'opacité est telle que l'œil n'est plus à même d'apprécier une différence entre les deux réactions.

commence sur notre graphique en D, mais il est évident que si l'écart au départ est moindre, la limite D se rapproche de la ligne des ordonnées. L'écart permanent des lignes A et B à droite de D tient à l'opacité propre de la mélanine.

Pour avoir des résultats nets, il faut s'adresser à un sérum

qui ne floccule pas avec trop d'intensité, car lorsque les chiffres d'opacité du mélange relevés au photomètre dépassent 300 avec écrans Wratten α 70 et O-A, le précipité formé adhère partiellement au verre; d'autre part, la taille des grains s'oppose à une suspension homogène et les chiffres de la lecture varient grandement avec les moyens employés pour mélanger le contenu du tube.

La réaction à la mélanine est encore visible entre les deux parallèles N et M, alors que la floculation dans l'eau salée sans mélanine n'est déjà plus appréciable macroscopiquement. Mais, comme l'indique le graphique, en décroissant, elles restent encore aisément perceptibles au photomètre V. B. Y. L'écartement des deux courbes reste à peu près constant; par conséquent, les deux floculations sont pareillement influencées par la concentration moléculaire et non pas l'une seule d'entre elles comme porterait à le croire la réaction macroscopique.

Henry considère la floculation dans l'eau distillée comme un phénomène tout différent de la mélanofloculation; c'est pour cela qu'il a cherché à neutraliser l'action de l'eau distillée en y ajoutant des sels neutres. Dans notre graphique, la floculation à la mélanine devient invisible au delà de M, et la réaction dans ce cas est considérée comme négative. La floculation dans l'eau distillée visible macroscopiquement en deçà de N doit, d'après Henry, être considérée comme non spécifique. Dans la zone de concentration variant de N à M, la mélanine floccule apparemment seule, et, sans le secours d'un appareil optique tel que le photomètre de V. B. Y., on serait porté à croire que la floculation dans l'eau distillée est seule entravée par l'élévation de la concentration et que les deux réactions sont indépendantes l'une de l'autre, mais il n'en est rien. Il est évident que la floculation de la mélanine n'est pas plus spécifique entre M et N qu'en deçà de N. En réalité, si au lieu de s'en tenir au seul secours de l'œil, on emploie un appareil plus délicat comme le photomètre V. B. Y., on s'aperçoit que la réaction à la mélanine est encore manifeste après le point M, de même que la floculation dans l'eau distillée persiste au delà de N. Au total, comme l'indique le parallélisme des courbes, la mélanofloculation n'est pas autre chose qu'une floculation dans l'eau distillée,

rendue plus apparente par addition de mélanine. En mesurant l'une, on connaît le comportement du sérum vis-à-vis de l'autre.

FLOCCULATION DANS L'EAU DISTILLÉE. — L'intensité varie d'un sérum à l'autre. Il arrive souvent qu'un sérum de paludéen floccule apparemment très peu dans l'eau distillée quand on le

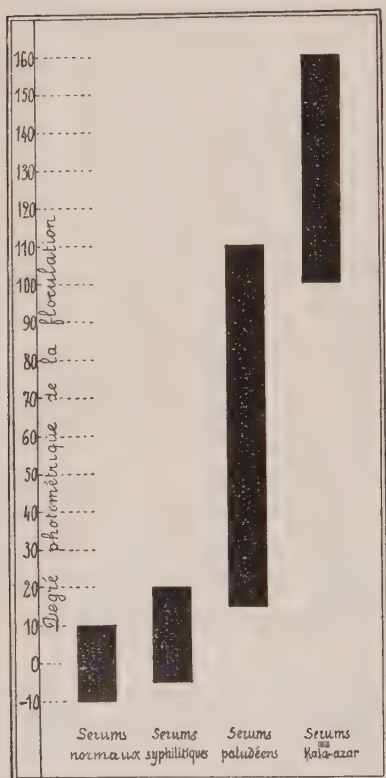


FIG. 2. — L'intensité de la flocculation dans l'eau distillée des divers sérums normaux et pathologiques. Le graphique a été établi sans prendre en considération les quelques rares sérums exceptionnels.

dilue à 1 p. 5 comme dans la réaction de Henry. Dans ce cas, la flocculation à la mélanine est seule macroscopiquement perceptible; mais en dilution à 1 p. 10 tous les sérums paludéens flocculent dans l'eau distillée comme nous l'avons constaté en collaboration, soit avec Prudhomme, soit avec M^{lle} Kœchlin [26, 27].

Le mélange plus riche en sérum donne des résultats inconstants et les mélanges moins riches des flocculations moins spécifiques.

L'intensité de la flocculation a été mesurée au photomètre V. B. Y., d'après la technique suivante : une première lecture faite aussitôt après le mélange de sérum et d'eau distillée donne la valeur de l'opacité de ce mélange. Au bout de trois heures de séjour à l'étuve à 37°, et ensuite de vingt minutes à la température du laboratoire, on procède à une seconde lecture.

Celle-ci indique la nouvelle valeur de l'opacité. La différence entre les deux chiffres observés donne l'intensité de la flocculation. Il est à remarquer que le chiffre de la première lecture est à peu près le même pour tous

les sérums que nous avons essayés et est compris entre 145 et 165.

Nous avons représenté les résultats dans le graphique ci-dessus qui a été construit d'après les données fournies par l'examen de 354 sérums : 158 sérums normaux, 130 sérums syphilitiques et 66 sérums paludéens.

Les sérums normaux floclent faiblement; pour 151 sérums, l'intensité de la réaction était au-dessous de 10, pour 6 autres, entre 10 et 15, et pour un seulement elle était de 21.

Les sérums syphilitiques floclent déjà sensiblement plus. Si 105 de 130 sérums ont présenté une flocculation au-dessous de 10, 12 sérums floclaient entre 10 et 15, et 13 à plus de 15.

Les sérums paludéens prélevés en dehors de l'accès ont tous présenté une flocculation au-dessus de 10. 60 sérums sur 66 ont donné une flocculation comprise entre 20 et 115, 3 entre 15 et 20 et les 3 derniers entre 10 et 15.

Il est superflu d'ajouter que la réaction de Henry à la mélanine fournit des indications tout à fait comparables dès que la flocculation dans l'eau distillée dépasse 15-20.

En résumé, les sérums normaux, syphilitiques et paludéens mélangés au dixième avec l'eau distillée se distinguent nettement les uns des autres par l'intensité de la flocculation.

Les sérums normaux ne floclent pas ou floclent peu.

Les sérums syphilitiques floclent légèrement dans l'eau distillée et Klausner a proposé d'utiliser cette propriété pour le diagnostic de la syphilis. En collaboration avec Prudhomme, nous avons constaté que, si la plupart des sérums syphilitiques floclent légèrement lorsqu'ils sont dilués au dixième dans l'eau distillée, ils ne floclent pas tous. La zone de flocculation, dans l'échelle d'intensité, est nettement au-dessous de celle des sérums paludéens et empiète, mais rarement, sur celle-ci. Dans ce dernier cas, il s'agit de sérums syphilitiques positifs à la mélanoflocculation. Elle empiète aussi, d'autre part, sur la zone de flocculation des sérums normaux.

Les sérums paludéens floclent avec intensité. Les sérums de Kala-azar se troublent presque instantanément et donnent par cette méthode des chiffres très élevés, souvent même l'opacité trop forte du flocculat interdit dès le début toute lecture. Si la première lecture permet de noter un chiffre, il peut arriver

que celui de la deuxième lecture soit inférieur : c'est que le flocculat adhérent au verre du tube ne figure plus dans la cellule du photomètre. Pour éviter cet inconvénient, il convient d'agiter de temps en temps les tubes pendant leur séjour à l'étuve.

Nous tenons à souligner que la mélanofloculation suit fidèlement la floculation dans l'eau distillée et qu'il est impossible de trouver un sérum positif à la mélanine qui ne soit en même temps instable dans l'eau distillée.

L'expérience suivante, faite par Prudhomme [81] sur notre conseil, est à cet égard très démonstrative. D'un sérum palustre très instable dans l'eau distillée et y flocculant à la dilution de 1 p. 5, on sépare le flocculat par centrifugation. Le liquide surnageant, limpide, additionné de mélanine, ne manifeste plus aucune tendance à la floculation. Les substances actives ont été précipitées par l'eau distillée. Si l'on reprend le précipité par une quantité d'eau physiologique égale à la quantité de sérum employé, on obtient un liquide de même valeur réactionnelle que le sérum primitif et qui, aux mêmes doses que lui, donnera lieu à une floculation très intense soit à l'eau distillée, soit à la mélanine.

Cette dilution du précipité en eau physiologique se comporte exactement comme le sérum d'où il provient, car si, comme le fait Henry, nous en mettons 0 c. c. 2 pour 1 cent. cube d'une solution saline à 2-4 p. 1.000, la mélanine floccule, alors que le tube témoin sans mélanine reste clair.

D'autres sérums paludéens sont plus stables et ne flocculent pas en dilution à 1 p. 5 dans l'eau distillée, mais flocculent toujours en présence de mélanine ; dilués au dixième, ils se troublent plus ou moins et, comme dans l'expérience précédente, on peut récupérer un précipité actif.

Les sérums normaux ne flocculent pas dans l'eau distillée additionnée ou non de mélanine. Mais, comme ci-dessus, il est possible d'obtenir un précipité actif en les diluant à 1 p. 40, à 1 p. 50, et même parfois plus.

En définitive, il n'existe qu'une distinction quantitative entre les sérums paludéens très instables et les sérums normaux. Les premiers précipitent à une dilution beaucoup plus faible que les autres. Il en résulte qu'on peut prévoir la réponse à la mélanine en mesurant exactement la floculation du sérum dans l'eau distillée.

RÔLE DE LA MÉLANINE DANS LA RÉACTION.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que le principe actif de la réaction n'est pas la mélanine, mais l'eau distillée. C'est l'eau distillée qui provoque la floculation du sérum dans la réaction de Henry. Les grains de mélanine s'attachent aux flocons de sérum et rendent la précipitation plus apparente. Le seul mérite que la mélanine possède est de permettre la lecture de la réaction à l'œil nu quand, pour certains sérums, la floculation dans l'eau distillée est faible. Elle joue donc le rôle d'indicateur, mais cette opinion n'est pas généralement acceptée et il faut la discuter.

Que la mélanine seule soit incapable de produire un changement quelconque dans le sérum des paludéens, on le voit par le fait que ce sérum pur ou dilué dans des solutions isotoniques de sels neutres et additionné de mélanine reste sans changement. Mais il suffit de produire une précipitation même discrète de certaines fractions protéiques du sérum pour que la mélanine commence à exercer son action en rendant la floculation plus apparente. Dans la réaction de Henry, cette précipitation du sérum est provoquée, comme nous l'avons vu, par l'eau distillée.

Mais elle peut être produite par n'importe quel agent physique ou chimique qui entraîne la précipitation des mêmes fractions de protéines sériques, que ce soit en milieu isotonique ou même hypertonique. En effet, une dilution du sérum à 2 p. 10 dans l'eau physiologique à 8,5 p. 1.000, ajustée à pH 5,4 reste claire; mais si on y ajoute de la mélanine ou certains autres colloïdes, elle flocule. Ce résultat est obtenu non seulement avec les sérums de paludéens mais aussi avec presque tous les sérums normaux. Le mécanisme de cette réaction est le suivant: on sait, d'après Vlès et Coulon [100] que le sérum possède trois points isoélectriques, l'un compris entre pH 9,0 et 12,0, l'autre à environ pH 5,4 et le troisième au-dessous de pH 3,0. En opérant à pH 5,4-5,5 on se trouve précisément à l'un des trois points où la stabilité d'une des fractions protéiques passe par un minimum et où l'addition de substances colloïdales, de certains sels ou de suspensions diverses suffit à

déclencher la floculation. 5,4 étant le point le plus constant des points isoélectriques, on comprend que, dans l'expérience, presque tous les sérums répondent positivement [33].

Les solutions de sels acides à ce pH donnent des résultats analogues, comme l'a vu Trensz [92], avec une solution de phosphate monobasique d'ammonium à 10 ou 15 p. 4.000. Nous avons constaté que le sérum flocule toujours, même dans des solutions hypertoniques de phosphates à 5 et 10 p. 100. Seule agit la concentration en ions hydrogène.

Il est évident qu'on peut imaginer toute une série de cas où la réaction à la mélanine se montre positive en utilisant un précipitant quelconque de protéines actives. C'est ainsi que Trens [97], en additionnant un sérum positif non dilué d'une faible dose d'acide phénique et de mélanine solubilisée, observe une floculation plus ou moins intense. Nous avons répété cette expérience à l'aide de mélanine non dissoute et nous avons obtenu comme lui un résultat positif. Ici, le facteur actif n'est point la mélanine, mais le phénol. L'opacification, car nous n'avons jamais observé de véritable floculation, apparaît avec les sérums paludéens, mais plus nettement encore avec les sérums tuberculeux facilement précipitables par les phénols. Si, au lieu de mélanine, on se sert de carmin légèrement phéniqué, on obtient une floculation, ou mieux, une opacification identique à celle de Trens. Cette observation prouve sans conteste que l'élément actif dans cette réaction est non pas la mélanine, mais l'acide phénique, la mélanine n'intervenant que pour intensifier la précipitation préexistante. La seule conclusion qu'on puisse tirer de cette expérience, c'est que les sérums paludéens, comme les sérums tuberculeux, sont plus facilement précipitables par les phénols que les sérums normaux.

L'instabilisation ou la précipitation préalable de certaines fractions protéiques du sérum importe seule dans toutes ces réactions dont on pourrait multiplier le nombre à l'infini.

Mais on n'est autorisé à désigner aucune d'entre elles sous le nom de réaction de Henry, car elles n'ont avec celle-ci qu'un point commun : la précipitation de la mélanine ou de tout autre indicateur.

Nous avons vu plus haut que le carmin est susceptible de jouer dans une réaction d'opacification le même rôle que la

mélanine. Ce même corps est utilisable dans la réaction à l'eau distillée ; il n'est d'ailleurs pas seul, un grand nombre d'autres corps se montrent sensiblement équivalents. Toutes les substances à poids moléculaire élevé, colloïdales ou pulvérulentes pourraient être utilisées à condition d'avoir une certaine affinité pour les euglobulines et de présenter une charge électrique qui, d'après Prudhomme [80], doit être négative pour un p_H de 7 à 9. Il convient aussi que les solutions ou suspensions en soient d'une faible concentration moléculaire et sensiblement neutre.

Tous ces corps qui intensifient ou plus exactement rendent visible un phénomène souvent inapparent méritent bien le nom d'indicateurs. Le choix d'un indicateur est important, car les résultats obtenus avec des indicateurs différents ne sont pas forcément comparables. Nous avons déjà dit que l'indicateur doit être neutre, de concentration moléculaire faible pour ne pas gêner la précipitation des euglobulines et autant que possible inerte pour éviter des réactions surajoutées avec les protéines sériques et les sels utilisés. Évidemment, les réactions ne seront pas identiques dans un mélange sérum + sels minéraux + colloïdes étranger et dans un mélange sérum + sels minéraux + substance inerte. En réalité, il n'existe pas de substances tout à fait inertes, car toutes interviennent plus ou moins dans les réactions. Si on se reporte au travail de Faubregoule [43] qui a pratiqué la réaction pour le paludisme par la méthode de Henry et celle de Trenszt, on constate une différence parfois assez nette dans les résultats obtenus. Cette différence ne peut être expliquée que par l'existence des réactions secondaires qu'un indicateur peut engendrer dans un mélange protéinique complexe. Ces réactions ne jouissent pas d'un caractère spécifique, la diversité des résultats obtenus l'indique surabondamment.

On voit qu'il est possible de trouver plusieurs centaines de réactions pour le paludisme en utilisant l'une ou l'autre de des substances indicatrices. La plus pratique est sans doute la suspension de carmin qui peut être très facilement préparée dans n'importe quel laboratoire, même très mal outillé.

MÉCANISME CHIMIQUE DE LA RÉACTION.

Nous avons étudié ce mécanisme en détail ailleurs [25]. Nous nous bornons ici à le résumer brièvement. Comme la réaction de Henry ne dénonce que l'instabilité du sérum dans l'eau distillée, il en résulte que tous les facteurs tendant à sensibiliser ou au contraire à stabiliser le sérum devant l'action de l'eau distillée, doivent intervenir dans la réaction. Parmi les substances qui favorisent la réaction, il faut citer en premier lieu les euglobulines, dont le rôle a été entrevu pour la première fois par Gille [46] et Trensz. Tous les auteurs sont à présent d'accord pour reconnaître que l'augmentation des euglobulines est le facteur principal de la réaction. La discussion persiste encore sur l'identité des euglobulines extraites du sérum normal et celles qui existent dans le sérum paludéen. D'après Trenz [93], les euglobulines paludéennes se comportent très différemment des euglobulines normales dans la réaction à la mélanine. Nos expériences ne nous ont pas permis de trouver une différence nette entre ces deux substances. Un sérum enrichi en euglobulines normales ou en euglobulines paludéennes floccule de même manière avec la mélanine. Ce qui importe, c'est la quantité de ce corps introduit dans le sérum. Si la dose est petite, la floculation dans l'eau distillée est faible et souvent invisible sans addition d'indicateur. Un tel sérum donne une réaction typique sans « surfloculation ». Si la dose d'euglobulines additionnées est plus forte, une « surfloculation » se manifeste avec plus ou moins d'intensité.

Si les euglobulines agissent sûrement dans la réaction, elles ne sont pas les seules à intervenir, car le lavage à l'éther d'un sérum positif affaiblit sensiblement la réaction. Nous avons constaté que l'éther n'agit, ni par abaissement de la tension superficielle [36], comme le pensent Benhamou et Gille [7], ni par altération des euglobulines, il enlève seulement une partie des substances actives qui appartiennent soit à la série des lipoides, soit aux cholestérols. Il existe ici une contradiction apparente entre ce que nous avançons et ce qu'on sait relativement à la diminution du taux de la cholestérine au cours du paludisme et d'autre part, à la stabilité des sérums riches en cholestérine en présence de l'eau distillée. Cela tient à ce que normalement ces corps se trouvent dans le sérum en plus grande

partie sous forme des complexes lipo-protéiniques souvent solubles dans l'eau distillée [67, 84]. L'expérience nous conduit à admettre qu'il doit y avoir une modification de certains complexes lipo-protéiniques au cours du paludisme, et ce n'est pas tellement la quantité de cholestérine et de graisses qui importe, mais la forme sous laquelle se trouvent ces corps dans le sérum. Il est évident que d'autres substances qui peuvent rendre le sérum instable, interviennent aussi dans la réaction, mais la quantité en est très faible et elles ne jouent qu'un rôle secondaire comparativement à celui des euglobulines et des lipoïdes.

Parmi les substances qui entravent la réaction, il faut mettre en première ligne les sérines : et de fait, nous savons que le plus souvent au cours du paludisme le taux des sérines s'abaisse en concomitance avec l'augmentation des euglobulines.

Les pseudoglobulines n'interviennent presque pas dans la réaction.

La concentration moléculaire est un facteur important de la réaction, car c'est l'abaissement de la teneur en sels minéraux qui produit la précipitation des euglobulines.

En résumé, la réaction de Henry dénote un déséquilibre lipo-protéinique du sérum dont les facteurs sont d'abord l'augmentation des euglobuline, puis la diminution des sérines, et enfin la présence des graisses et de la cholestérine libres ou incluses dans des complexes insolubles dans l'eau distillée.

CHAUFFAGE DU SÉRUM [24].

Les sérums positifs de paludéens chauffés à 55° pendant une demi-heure cessent de flocculer dans l'eau distillée formolée et de ce fait la mélanofloculation se trouve entravée. Les sérums, rendus positifs par addition de globulines deviennent aussi négatifs après avoir été chauffés dans les mêmes conditions, comme nous le voyons d'après les chiffres ci-dessous :

	RÉACTION en eau distillée	RÉACTION en eau salée
Sérum normal	42	26,5
Sérum + globulines	89,5	54,4
Sérum + globulines, chauffés.	44,5	27

Nous avons indiqué précédemment que la concentration moléculaire du sérum, pas plus que la quantité de diverses protéines sériques ne varient au cours d'un chauffage d'une demi-heure à 55°. On sait aussi que les globulines ne sont pas altérées à cette température.

Pour tenter de savoir à quoi est due cette stabilité du sérum chauffé, nous prenons un sérum normal dont une partie est chauffée à 55° pendant une demi-heure et nous ajoutons 10 grammes par litre de globulines dans l'un et dans l'autre. La réaction dans l'eau distillée pratiquée avec le sérum normal est égale à 41°. Après l'addition de globulines, elle passe à 69°. Pour le sérum chauffé, on a respectivement 34° et 43°. Dans le premier cas, le degré photométrique de la réaction présente une différence de 28°; dans le deuxième cas, seulement de 11°.

Les globulines incorporées dans le sérum chauffé précipitent donc plus difficilement sous l'action de l'eau distillée.

Il résulte de cette expérience qu'une même quantité d'euglobulines incorporée dans nos deux sérums y produit des effets tout différents. Cette observation ne permet pas d'accepter l'hypothèse de Trenz qui veut que, dans le sérum enrichi par des euglobulines, ce soient les euglobulines ajoutées qui seules précipitent, le reste du sérum n'intervenant pas dans la réaction.

Nous avons fini par découvrir avec Prudhomme la cause la plus importante de cette paralysie de la réaction. Elle est due à l'alcalinisation du sérum par départ de CO_2 sous l'influence du chauffage. Il suffit de ramener par addition de CO_2 le pH du sérum chauffé à ce qu'il était avant chauffage pour que ce sérum floccule de nouveau avec la même intensité qu'auparavant. Cette expérience démontre que le pH joue un rôle d'une importance primordiale et que la zone de pH où se produit la floculation est bien plus restreinte qu'on ne pouvait le supposer d'après les expériences de Trenz : de 5,4 à 9.

TECHNIQUES DE LA RÉACTION.

D'après tout ce que nous savons de la réaction de Henry, l'application clinique s'en trouve légèrement modifiée. Au point de vue technique, il revient au même de mesurer la

floculation du sérum en eau distillée pure ou additionnée de divers indicateurs. Nous donnerons ci-dessous les diverses méthodes employées et l'interprétation qu'on en peut tirer.

RÉACTION AVEC INDICATEURS.

L'utilisation d'indicateurs trouve sa raison d'être dans les laboratoires qui ne possèdent pas de photomètre.

Parmi les nombreuses substances proposées par les divers auteurs : mélanine des yeux de bœufs non dissoute, ou dissoute par l'antiformine (Henry) [51], ou par action alternative de soude et d'acide (Trensz) [91], la mélanine de cheval dissoute ou non (Henry, Greig, Van Rooyen, Hendry) [50], celle de seiche (Livierato, Vagliano et Constantakato) [61], la mélanine artificielle (Villain et Dupoux) [99 bis], l'albuminate de fer, le métharfer de Bouty (Henry) [51], le bleu de méthylène, le rouge de phénol, le rouge de méthyle (Greig, Hendry et Van Rooyen) [50], l'émulsion microbienne ou tout simplement la suspension du carmin dans l'eau distillée (Prudhomme) [80], deux présentent un intérêt pratique, ce sont la mélanine extraite des yeux de bœufs non dissoute qu'Henry utilise pour sa réaction de longue date, dont la valeur a été vérifiée à peu près dans tous les pays, et la suspension de carmin. La mélanine présente l'inconvénient d'être d'une préparation et d'un titrage délicats. C'est pourquoi nous croyons que le carmin pourra remplacer avantageusement la mélanine dans les laboratoires où la préparation de celle-ci est difficile à réaliser.

Parmi les autres indicateurs, certains sont d'une préparation encore plus délicate sans présenter un avantage quelconque sur la mélanine d'Henry ; certains autres se sont montrés moins sensibles et sont pratiquement abandonnés. Le carmin possède l'avantage inéniéable d'être d'une préparation très facile même pour les laboratoires les plus mal outillés.

Voici la technique de la réaction au carmin qui ne diffère de celle de Henry que par l'indicateur :

1° PRÉPARATION DE LA SUSPENSION DE CARMIN [80] : Environ 0 gr. 5 de carmin R. A. L. n° 40 finement broyés dans un mortier sont agités fortement pendant cinq minutes dans un ballon

à perles, à sec. On ajoute alors 1 cent. cube d'eau distillée et on agite à nouveau deux minutes. Au bout de ce temps, on additionne encore le mélange d'eau distillée (25 cent. cubes) et on le secoue encore vivement pendant deux minutes. La suspension est centrifugée doucement pendant une minute pour éliminer les particules les plus grosses. Le liquide surnageant est étendu d'eau distillée de telle sorte que, dilué au 1/10 il donne au photomètre une opacité de 30° plus forte que celle de la cuve remplie d'eau.

Dans les laboratoires ne possédant pas de photomètre de V. Y. B. on opère ainsi : on dilue 0 gr. 015 de fuchsine basique R. A. L. dans 100 cent. cubes d'alcool absolu ; cette solution diluée dans l'eau distillée à raison de 0 c.c. 5 pour 10 cent. cubes d'eau donne la teinte, observée sur fond blanc, à laquelle doit être ramenée la suspension de carmin diluée au 1/10 et qui alors correspond à une opacité photométrique égale environ à celle de la préparation précédente.

2° On alcalinise l'eau distillée en ajoutant à 100 cent. cubes d'eau, 0 c.c. 25 de soude à 1/100 N.

3° On prépare une solution de formol du commerce à 1 p. 200.

Ces solutions ne peuvent être conservées que pendant une à deux semaines au maximum.

Au moment de la préparation de la réaction, on prend deux tubes : dans le premier A, on met 8 cent. cubes d'eau distillée alcalinisée + 1 cent. cube de formol à 1 p. 200 + 1 cent. cube de suspension de carmin.

Dans le deuxième tube B, on place 9 cent. cubes d'eau distillée alcalinisée + 1 cent. cube de formol à 1 p. 200.

Réaction. — Elle se fait dans deux tubes à hémolyse.

Dans le premier on met 1 cent. cube du contenu du tube A ;

Dans le deuxième, 1 cent. cube de la dilution du tube B.

Les deux tubes sont additionnés de 0 c.c. 2 de sérum à examiner, bien mélangés sans produire de bulles d'air, bouchés au liège et mis à l'étuve à 37° C pour trois heures.

Retirés de l'étuve, on les laisse à la température du laboratoire une demi-heure et on procède à la lecture.

Trois cas peuvent se présenter :

1° Des réactions très positives : on voit une floculation plus ou moins abondante dans les deux tubes.

2° Le tube témoin sans carmin reste clair ; celui qui renferme le carmin présente une floculation plus ou moins apparente. Il y a réaction positive d'intensité moyenne.

3° Les deux tubes restent tels qu'ils étaient au moment de la préparation et ne présentent aucune floculation. Ce sont des réactions négatives.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION SANS INDICATEUR.

La réaction à l'eau distillée est d'une pratique très simple, mais elle exige pour les lectures le secours du photomètre de Vernes.

Après plusieurs essais faits, soit avec Prudhomme, soit avec M^{lle} Koechlin [26, 27 et 34], nous nous sommes arrêté à la technique suivante qu'il est nécessaire d'appliquer rigoureusement pour obtenir des résultats probants.

1° PRISE DE SANG. — Elle doit être faite de préférence à jeun et en dehors de toute période fébrile.

2° CONSERVATION DU SANG. — La réaction doit être pratiquée vingt-quatre heures après la prise de sang. Celui-ci doit être conservé à la glacière et le sérum n'être séparé du caillot qu'au moment d'exécuter la réaction. Il ne faut utiliser que des sérums parfaitement liquides, débarrassés des globules rouges par centrifugation et non chauffés.

3° PRATIQUE DE LA RÉACTION. — La verrerie doit être chimiquement pure, lavée au mélange sulfo-chromique. On se sert, pour chaque réaction de deux tubes à hémolyse. On met dans chaque tube 1 c.c. 8 d'eau distillée. Puis dans le premier, on ajoute 0 c.c. 2 de sérum à examiner ; après avoir mélangé le contenu en évitant de produire de la mousse, on verse rapidement le mélange dans la cuve du photomètre et on fait la première lecture. A ce moment on procède de même pour le deuxième tube. On a ainsi 2 tubes identiques qui se contrôlent l'un par l'autre.

Il est indispensable d'opérer séparément sur les deux tubes parce que certains sérums flocculent très vite. C'est pour la même raison que les lectures doivent succéder aussi rapidement que possible à l'introduction du sérum pathologique dans le tube.

Ensuite les tubes dans lesquels, après la lecture photométrique, a été reporté le mélange, sont bouchés au liège, placés à l'étuve à 37°C pour trois heures. Retirés de l'étuve, on les laisse à la température du laboratoire pendant vingt minutes et l'on procède à la deuxième lecture du photomètre. Le chiffre de la réaction s'obtient en soustrayant celui de la première lecture de celui de la deuxième. La différence entre les deux tubes d'un même sérum ne doit pas dépasser 2 à 3 degrés photométriques quand la réaction est bien exécutée; dans le cas contraire, il est nécessaire de refaire la réaction.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

1° Les chiffres inférieurs à 10 indiquent qu'on a affaire à un sérum non paludéen.

2° Les chiffres de 10 à 20 doivent être considérés comme suspects.

Cette zone de flocculation correspond à certains sérums syphilitiques, tuberculeux, et aussi à quelques sérums paludéens. Les paludéens, surtout porteurs de *P. præcox*, qui prennent de la quinine préventive régulièrement, et qui, bien que parasités, n'ont présenté que peu ou pas d'accès francs, entrent dans ce groupe.

3° Les chiffres supérieurs à 20, jusqu'à 100 et rarement plus, indiquent généralement un sérum paludéen. Le nombre des sérums non paludéens qui flocculent dans l'eau distillée avec cette intensité est très faible.

4° Les sérums de kala-azar se montrent encore plus instables dans l'eau distillée. La flocculation est massive d'emblée. La première lecture égale à 250-300 et souvent même plus, au lieu de 140-200 comme pour les autres sérums, la différence entre les deux lectures dépassant 100 sont deux signes de présomption d'une affection viscérale à leishmanies. Dans le cas d'une flocculation très intense, il est nécessaire, comme nous l'avons déjà dit plus haut, d'agiter le tube de temps en temps pendant

qu'il est à l'étuve afin d'éviter l'adhérence du précipité au verre, ce qui pourrait fausser la lecture.

Dans notre réaction, la limite de positivité est abaissée par rapport à la réaction de la mélanine. Les raisons qui nous ont poussés à accepter ces chiffres sont les suivantes :

On sait que la réaction à la mélanine se trouve rarement positive en dehors du paludisme et de quelques autres affections (maladies à protozoaires, spirochétoses); cependant, de nombreux auteurs ont vu la réaction à la mélanine être très faible, ou même négative, au cours du paludisme. Si l'on tient compte des fautes de technique, ces cas se montrent avec une très grande rareté. Aussi nous avons pensé qu'on peut considérer une réaction négative comme un critérium éliminatoire du paludisme. Jusqu'à présent, nos observations qui portent sur plus de 200 malades nous permettent d'affirmer qu'un sérum présentant une floculation dans l'eau distillée inférieure à 10 n'appartient sûrement pas à un paludéen, quand la prise de sang a été faite en dehors de l'accès fébrile.

APPLICATION CLINIQUE DE LA RÉACTION.

1° Évolution de la réaction de Henry au cours du paludisme [24].

L'évolution de la réaction de Henry au cours de l'infection palustre a été étudiée sur les paralytiques généraux impaludés dans un but thérapeutique. Nous avons constaté que chez ces malades impaludés par injection de sang, la mélano-floculation est souvent positive avant le premier accès, dans le cas où la période d'incubation dépasse quatre à cinq jours; elle croît ensuite d'intensité, régulièrement, jusqu'au cinquième ou septième accès où elle atteint son maximum. Nos malades ont été traités à la quinine au huitième accès. Après cessation de toute fièvre, la malaria-floculation reste à son maximum d'intensité pendant sept à dix jours et ensuite décroît régulièrement. Dans le cas de guérison, elle devient négative trente à cinquante jours après le commencement du traitement quinique. Chez les paludéens infectés par piqûres d'anophèles, elle disparaît plus lentement en quarante à soixante-dix jours. Alcaÿ, Cattoir et

Marill [4], en Algérie; Le Bourdellès et Fribourg-Blanc, au Val-de-Grâce [57] ont fait des constatations analogues.

Avec la quinacrine, la réaction devient négative plus rapidement qu'avec la quinine. Nous avons vu des malades dont le sérum donnait une réaction négative vingt-sept jours après le commencement du traitement.

La floculation dans l'eau distillée suit la même marche qu'avec la mélanine. A partir du quatrième ou cinquième accès, le sérum floccule spontanément à 1 p. 5 dans l'eau distillée.

Le traitement influence pareillement les deux floculations.

Henry d'abord, et tous les expérimentateurs ensuite, ont observé qu'au moment de l'accès la réaction devient négative. Par prises de sang successives sur le même malade, nous avons établi que l'affaiblissement ou la disparition de la réaction précède de peu l'ascension thermique, et dure presque jusqu'à l'acmé. La réaction redevient positive dès que la température descend. Le mécanisme de cette action est le suivant :

Si l'élévation de la température du malade n'entrave pas la réaction, si la quantité d'euglobulines ne manifeste aucune variation appréciable au cours de l'accès, la concentration moléculaire au contraire subit des écarts notables. Les mesures que nous avons faites pendant l'apyrexie et au moment de l'accès nous ont donné les chiffres suivants : en période d'apyrexie, le Δ du sérum est égal en moyenne à $-0^{\circ}55$, légèrement plus faible que le Δ du sérum normal; au moment de l'accès, le Δ est égal à $-0^{\circ}62$ en moyenne, ce qui correspond à une élévation de la concentration moléculaire égale environ à 2 grammes de NaCl par litre. En diminuant par dialyse la concentration moléculaire du sérum prélevé au moment de l'accès, on enlève l'excès de sel et la réaction devient positive.

L'augmentation de la concentration moléculaire au cours de l'accès est produite par la destruction des globules rouges parasités qui sont riches en potassium. En effet, ce corps a été retrouvé dans le sérum, chez les paludéens en accès, en quantité beaucoup plus grande qu'en apyrexie par Pinelli [78] et Andriadze [5]. Expérimentalement, nous avons établi que les sels de potassium exercent sur la solubilité des euglobulines, à la même concentration moléculaire, une action légèrement supérieure à celle des sels de sodium.

On sait aussi qu'après l'accès, les urines des paludéens se chargent en potassium. Très vite la concentration du sang baisse jusqu'à la normale par régulation rénale, en même temps que la réaction redevient positive. Mais les variations de la concentration moléculaire ne sont probablement pas les seules à intervenir ici.

RÉSULTATS PRATIQUES DE LA RÉACTION.

La valeur clinique de la mélanofloculation est bien démontrée par les travaux d'Adida [3], de Biasiotti [8], Bonalberti [9], de Bonnet [40], de Brotzu [42], de Cartana Castella [45], de Chorine [22, 28 et 30], de Coradetti [39], de Dhont [40], de Farjot [41], de Henry, de Greig et ses collaborateurs [50], de Lavergne et Monier [55], de Le Bourdellès et ses élèves, de Chabrelié [59, 47], de Fribourg-Blanc [57], de Liégeois et Velluz [58, 60], de Livierato et Salata [62], de Kappus [52], de Meersseman et Lacour [70], de Marchoux [68], de Nanni [72], de Pozzi [79], de Rodillon [82], de Sabatucci [83], de Théobalt [86], de Tzecnovitzer et ses collaborateurs [96], de Vialatte et Ramotet [99], de Voigtlander [104], de Trens [93], etc.

Tous ces auteurs sont d'accord pour reconnaître que les sérums paludéens répondent positivement à la mélanine, mais presque tous ont observé des réactions positives en dehors du paludisme. La proportion des réactions positives spécifiques et non spécifiques varient suivant les auteurs dans des proportions très larges. Cette différence est principalement due aux défauts des préparations de mélanine. Nos observations nous conduisent à accepter 5 à 6 p. 100 de réactions positives non spécifiques avec la mélanine. Avec l'eau distillée ce pourcentage augmente à peine de 1 à 2 p. 100.

On comprend aisément qu'il soit possible de rencontrer des réactions positives en dehors du paludisme, car plusieurs maladies réalisent le même déséquilibre sérique.

La réaction de Henry donne un résultat positif, en dehors du paludisme, d'une façon constante dans le kala-azar viscéral (Henry, Chorine, Trens), dans le typhus exanthématique où elle suit la réaction de Weill-Félix (Tzecnovitzer et ses élèves [95], Henry [51]), dans certains cas de cirrhose de Laennec (Chorine et Gillier [25]), de cirrhose de Hanot, d'ictère

hémolytique, de septicémie streptococcique (Dhont [40]), parfois dans les leucémies (Nanni [72]), chez certains lépreux, rarement dans la fièvre typhoïde (Dhont [40]) et d'une façon inconstante dans la syphilis et la tuberculose (Le Bourdellès [56], Chorine [26], Farjot [41], Dhont [40], Voigtlander [101]). Chez les animaux, on trouve la réaction positive dans la trypanosomiase du cobaye (Trensz [88]) et du lapin (Chorine et Gillier [25]), dans la leishmaniose canine (Trensz [88]), dans la fièvre exanthématique des lapins et des cobayes (Karout [53]), dans la spirochétose des poules (Chorine [23]), dans la tuberculose du cobaye (Chwatt [37]), pour ne citer que ces seules affections.

Dès nos premières publications, nous avons insisté sur le fait que la réaction de Henry négative a plus de valeur que les réactions positives. Depuis, tous les travaux faits dans divers pays confirment notre opinion.

Nous admettons que la réaction négative est une épreuve éliminatoire de toute infection palustre, surtout quand elle est faite sans indicateur, car l'eau distillée employée seule augmente la sensibilité de la réaction au léger détriment de la spécificité. Elle n'en permet pas moins d'affirmer l'absence de malaria quand elle est négative, tandis que la réaction positive n'autorise pas, d'une façon catégorique, à porter le diagnostic de paludisme.

II

LA RÉACTION A LA RÉSORCINE DE VERNES

Tous les phénols possèdent la propriété de précipiter le sérum. Testoni [87], en 1926, a montré que le sérum de cheval précipite avec tous les phénols : phénol ordinaire, pyrocatechine, résorcine, hydroquinone, pyrogallol. En 1910, Pandy [77] utilisa le phénol pour le diagnostic de la méningite tuberculeuse. L'acide phénique à 6,25 p. 100 additionné du liquide céphalo-rachidien normal, à la dose de I goutte ne le trouble pas; mais il provoque un précipité plus ou moins apparent dans le liquide pathologique. L'auteur attribue cette

réaction à l'augmentation des globulines dans le liquide céphalo-rachidien des méningites. En 1926, Vernes, Bricq et Gager [98] ont étudié avec beaucoup de précision la floculation des sérums avec les divers phénols. Ils ont établi que les sérums tuberculeux présentent une sensibilité particulière et floculent en présence de ces corps chimiques avec plus d'intensité et à des dilutions plus faibles que les sérums normaux. Pour des raisons techniques, ils ont adopté la résorcine, produit stable et bien déterminé, pour obtenir une réaction de caractère plus ou moins spécifique dans la tuberculose. La valeur et les défauts de cette réaction sont maintenant bien connus. Ninni et de Blasi [76], en 1930, ont préconisé l'utilisation de phénol ordinaire pour le diagnostic de la syphilis et de la tuberculose.

RÔLE DES PROTÉINES SÉRIQUES DANS LA RÉACTION.

En collaboration avec Prudhomme [32] nous avons étudié le mécanisme de cette réaction.

Le problème se trouve plus simplifié que dans la réaction de Henry, car il s'agit non plus d'un prétendu antigène, mais d'un corps chimique simple parfaitement déterminé.

Pour élucider le rôle joué dans cette réaction par les diverses fractions protéiques, nous avons appliqué la méthode qui nous a servi pour la réaction de Henry. Les protéines sériques, extraites comme nous l'avons précisé plus haut, ont été ajoutées à des sérums normaux négatifs à la résorcine.

Les pseudoglobulines ne jouent qu'un faible rôle dans la réaction.

EXPÉRIENCE. — Un sérum humain est réparti en quatre tubes. Le premier sert de témoin, au deuxième on ajoute des pseudoglobulines à raison de 5 grammes, au troisième de 10 grammes, au quatrième de 20 grammes par litre. Comme dans toutes nos expériences précédentes sur l'addition des protéines, nous avons abandonné le mélange pendant deux heures à l'étuve à 37° C. et nous l'avons ensuite centrifugé. La réaction à la résorcine nous a donné les résultats suivants :

Sérum normal.	9
Sérum normal + 5 grammes de pseudoglobulines par litre . .	9
Sérum normal + 10 grammes de pseudoglobulines par litre. .	9
Sérum normal + 20 grammes de pseudoglobulines par litre. .	8

La réaction ne varie pas par addition de pseudoglobulines.

D'autres expériences nous ont donné des résultats identiques.

De même, l'addition de pseudoglobulines à un sérum tuberculeux très positif ne modifie que très légèrement la réaction. Voici une de nos expériences.

A un sérum positif on ajoute des doses croissantes de pseudoglobulines :

Sérum tuberculeux	41
Sérum tuberculeux + 10 grammes de pseudoglobulines par litre	41
Sérum tuberculeux + 20 grammes de pseudoglobulines par litre	36

Cependant le rôle des pseudoglobulines n'est pas tout à fait négligeable, comme nous le verrons plus loin.

ACTION DES SÉRINES.

On répartit un sérum humain négatif à la résorcine en quatre tubes. Le premier tube sert de témoin, au deuxième on ajoute des sérines en quantité correspondant à 5 grammes, au troisième à 10 grammes, et au quatrième à 20 grammes par litre. Le mélange est abandonné à l'étuve à 37° C. pendant deux heures et ensuite centrifugé pour le rendre parfaitement clair. La réaction pratiquée à la résorcine nous a donné les chiffres suivants :

Sérum normal	13
Sérum normal + 5 grammes de sérines par litre	13
Sérum normal + 10 grammes de sérines par litre	12
Sérum normal + 20 grammes de sérines par litre	13

Cette expérience nous montre que l'addition de sérines n'exerce aucune action sur la floculation à la résorcine du sérum normal.

Voyons maintenant comment ces protéines se comportent avec un sérum tuberculeux. Les expériences, faites comme précédemment, avec un sérum tuberculeux dont la réaction au photomètre de V. Y. B. est égale à 72, nous ont donné les résultats suivants :

Sérum tuberculeux	72
Sérum tuberculeux + 10 grammes de sérines par litre	41
Sérum tuberculeux + 20 grammes de sérines par litre	21

Il ressort clairement que l'augmentation des sérines dans un sérum tuberculeux le stabilise vis-à-vis de la résorcine et peut entraver complètement la réaction. Inversement on peut admettre que la diminution des sérines suffit à rendre positif un sérum négatif.

ACTION DES EUGLOBULINES.

Par addition de quantités croissantes d'euglobulines à un sérum normal, la réaction augmente en proportion des euglobulines ajoutées, comme le montre l'expérience ci-dessous choisie parmi plusieurs autres :

Un sérum normal est divisé en quatre parties. La première sert de témoin ; à la deuxième on ajoute des euglobulines à raison de 5 grammes, à la troisième de 10 grammes, à la quatrième de 15 grammes par litre. La floculation à la résorcine est représentée par les chiffres suivants :

Sérum normal	12
Sérum normal + 5 grammes d'euglobulines par litre	48
Sérum normal + 10 grammes d'euglobulines par litre	84
Sérum normal + 15 grammes d'euglobulines par litre	123

Avec les sérum tuberculeux, la réaction croît aussi au prorata des euglobulines ajoutées. Par conséquent, parmi les protéines sériques, ce sont les euglobulines seules qui intensifient la floculation du sérum au contact de la résorcine.

Pour ces expériences l'utilisation des euglobulines non deséchées est de beaucoup préférable, car, avec la poudre d'euglobulines, les résultats, bien que de même ordre, sont toujours moins démonstratifs.

CE N'EST PAS L'INSOLUBILITÉ DES EUGLOBULINES DANS L'EAU DISTILLÉE QUI EST EN QUESTION. — Si les euglobulines agissent dans la réaction de Henry par leur insolubilité dans l'eau distillée, il ne peut être question d'un pareil mécanisme pour la réaction à la résorcine. On peut trouver des sérums pathologiques très instables dans l'eau distillée et négatifs à la résorcine ou inversement, comme on peut le voir d'après les chiffres ci-dessous que nous avons relevés chez un certain nombre de malades.

	FLOCCULATION dans l'eau distillée	RÉACTION à la résorcine
Sérum n° 1	5	29
Sérum n° 2	13	135
Sérum n° 3	69	66
Sérum n° 4	9	50
Sérum n° 5	1	100
Sérum n° 6	138	84
Sérum n° 7	221	10
Sérum n° 8	120	86

La réaction est évidemment due à l'action coagulante des phénols sur les protéines.

LE RÔLE ACTIF APPARTIENT-IL A UNE FRACTION DES EUGLOBULINES ?
— Les euglobulines que nous avons utilisées dans les expériences citées ci-dessus ont été préparées par le sulfate d'ammonium et la dialyse.

Nous avons essayé de partager les globulines en fractions plus nombreuses pour savoir si le principe actif se trouve localisé dans une d'entre elles et s'il est la propriété exclusive des euglobulines.

Étant donné la quantité considérable de sérum qu'il faut utiliser pour ces expériences, nous nous sommes adressé au sérum de cheval que nous pouvons avoir à discrétion. Nous avons dialysé le sérum entier dans un sac de collodion ; au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures un précipité se forme au fond du sac qu'on sépare par centrifugation. Le liquide surnageant clair, dilué au 1/10 dans l'eau distillée, est saturé de gaz carbonique. On obtient ainsi un deuxième précipité préparé à nouveau par centrifugation.

Le reste des globulines est précipité à neutralité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et dialysé, desséché et réduit en poudre. On utilise les deux premières fractions à l'état frais.

La réaction à la résorcine, pratiquée avec ces sérums, a donné les résultats suivants :

Sérum normal	5
Sérum normal + précipité obtenu par CO_2	7
Sérum normal + précipité obtenu par $\text{SO}^*(\text{NH}^4)^2$	6
Sérum normal + précipité obtenu par dialyse	436

Toutes les substances actives se trouvent donc contenues dans le produit de la dialyse. On ne reconnaît aucune action au reste des globulines dont une partie tout au moins est encore insoluble dans l'eau distillée.

Nous avons essayé de pousser plus loin le fractionnement en soumettant les euglobulines de dialyse à l'action de solutions de NaCl de concentration croissante.

Nous avons traité le précipité dû à la dialyse du sérum total par une solution de NaCl à 2 p. 1.000. Après un contact d'une heure à l'étuve à 37° et centrifugation, le résidu est repris par une solution de NaCl à 4 p. 1.000 dans les mêmes conditions que précédemment et la partie insoluble est séparée par centrifugation. Nous diluons les solutions d'euglobulines ainsi obtenues par NaCl à 2 et 4 p. 1.000 dans vingt fois le volume d'eau distillée pour précipiter les protéines solubles dans les solutions faibles de sels et on sépare celles-ci par centrifugation. Le liquide surnageant est pratiquement dépourvu de protéines et ne donne aucune des réactions classiques de l'albumine. Nous possédons donc trois fractions d'euglobulines de plus en plus insolubles. On incorpore ces trois précipités sans les dessécher dans trois échantillons d'un même sérum à raison de 10 grammes par litre environ. La réaction à la résorcine nous renseigne de la façon suivante sur le comportement de chacun :

Sérum normal	2
Sérum normal + euglobulines solubles dans NaCl à 2 p. 100.	2
Sérum normal + euglobulines solubles dans NaCl à 4 p. 100.	10
Sérum normal + euglobulines insolubles dans le NaCl. même à 4 p. 100.	360

On peut diluer ce sérum extrêmement positif à 1 p. 9 dans du sérum normal; la réaction pratiquée avec ce sérum, encore positive, est égale à 47. Donc, toutes les substances actives se trouvent contenues dans les euglobulines et dans les euglobulines les plus insolubles. Celles-ci possèdent une activité si grande que 1 gramme de protéines par litre de sérum le rend positif à la résorcine. Ces fractionnements apportent la preuve que la fraction euglobulinique est constituée par des protéines et probablement par des complexes lipoprotéiniques divers. On sait par les travaux de Achard et de ses élèves [1] que les glo-

bulines augmentent dans la tuberculose. Cette augmentation doit probablement porter en partie sur la fraction que nous avons isolée, mais en partie seulement, car la fraction spécifique possède une activité telle qu'elle rendrait la réaction à la résorcine illisible, si elle était seule en jeu dans cet accroissement important des globulines.

Quand la quantité des euglobulines augmente en proportion considérable, comme parfois dans le paludisme, il arrive, et Henry le premier l'a signalé, que la réaction à la résorcine devienne positive. Il résulte de ces constatations que les fractions euglobuliniques prédominantes dans le paludisme et dans la tuberculose sont ordinairement différentes.

A la consultation de M. le professeur Marchoux, pour les maladies tropicales, nous avons rencontré deux malades paludéens à *Pl. vivax* chez qui, à plusieurs reprises, la réaction de Henry faite avec ou sans indicateur donnait des résultats douteux, tandis que la réaction à la résorcine était dans un cas égale à 79 et dans l'autre à 133. Les deux malades ne présentaient aucun signe de tuberculose. Il faut admettre qu'on puisse trouver dans le paludisme des réactions positives à la résorcine sans que la réaction de Henry suive la même évolution. Vernes et ses collaborateurs [98], à la suite de nombreuses observations, arrivent à la conclusion que la réaction résorcinique révèle surtout l'intervention d'un processus toxique surajouté. A la même conclusion arrive P. Bordet [11] qui a provoqué une réaction positive à la résorcine en inoculant à des lapins normaux la toxine du *B. coli*, ou à des animaux tuberculeux un peu de tuberculine.

La réaction à la résorcine serait donc très précieuse. Nous savons, en effet, que chez l'homme, naturellement résistant au bacille de Koch, la tuberculose évolue en raison de l'action exercée par les agents toxiques ou infectieux qui en altèrent la résistance. Elle permettrait ainsi de préjuger de l'entrée en sommeil ou au contraire de l'activité croissante de l'infection tuberculeuse. Aussi, Vernes attache-t-il une grande importance pronostique à une réaction résorcinique positive, de même que Achard à l'inversion du rapport sérine-globuline. Mais nous pensons que la résorcine pourrait aussi nous révéler l'instabilité organique d'un être exposé à la tuberculose, nous

inviter à en rechercher la cause et jouer ainsi un rôle important dans la prophylaxie.

Il se dégage de ces observations les conclusions suivantes : 1° la fraction active dans la réaction à la résorcine préexiste dans le sérum normal, mais elle augmente au cours de certaines infections; 2° les fractions de globulines qui croissent varient avec chaque malade; 3° les réactions donnent donc des renseignements plus précis que les dosages, puisqu'elles portent sur les fractions spécifiques des globulines que le dosage ne peut mettre en évidence.

III

KALA-AZAR (1).

C'est dans le kala-azar que le déséquilibre sérique qui nous intéresse atteint son maximum d'intensité. Les euglobulines se trouvent fortement augmentées, d'après les dosages de Lloyd et Paul [63] qui, au lieu de 5 p. 100 de protéines totales en trouvent en moyenne 50 p. 100 dans le sérum. Ce sérum présente en conséquence une instabilité très grande et on propose constamment de nouvelles réactions sérologiques, sans parler des réactions immunologiques d'agglutination ou de déviation du complément qui n'entrent pas dans le cadre de cet exposé.

On peut citer la formol-gélification de Gaté et Papacostas, la formolopacification de Napier, la réaction à l'eau distillée de Brahmachari, la réaction de Auricchio et Chieffi, les réactions au divers composés d'antimoine comme l'uréastibamine, le néostibosane, ou d'arsenic, sulfarsénol et novarsénobenzol, etc.; la réaction de Vernes à la résorcine a été toujours fortement positive dans les sérums de kala-azar que nous avons eus à notre disposition.

Nous aborderons maintenant à la lumière des résultats ci-dessus exposés l'étude du mécanisme de ces diverses réactions.

(1) Nous ne discuterons ici que les travaux relatifs au mécanisme de la réaction, laissant de côté ceux qui n'ont qu'un intérêt clinique.

LA FORMOL-GÉLIFICATION proposée premièrement par Gaté et Papacostas [45] pour le diagnostic de la syphilis en 1920, a été appliquée au sérum du kala-azar par Spackman [85] en 1921, ensuite par Napier [73] et par Fox et Mackie [42]. La technique en est très simple : on prépare trois tubes contenant chacun 1 cent. cube de sérum ; au premier tube on ajoute I goutte de formol de commerce, au deuxième II gouttes, au troisième III gouttes. On agite le mélange et on le laisse reposer jusqu'à ce que la gélification se manifeste. Avec des sérums très positifs, la gélification se produit en quelques minutes. Si le sérum reste liquide après vingt-quatre à trente-six heures, la réaction est considérée comme négative. Rappelons de suite que la formol-gélification se produit dans de très nombreuses maladies en dehors du kala-azar : la tuberculose, la lèpre, la syphilis, la maladie du sommeil, le paludisme, le cancer, la cirrhose du foie, etc. Malgré cela, si elle reste encore dans la pratique courante, c'est que la technique en est très simple et peut être exécutée par la plupart des praticiens. Plus la formol-gélification est rapide, plus elle possède de valeur pour le diagnostic du kala-azar ; mais elle est encore sujette à caution, car parfois elle se montre aussi promptement dans la lèpre, la tuberculose ou le cancer.

Spackman d'une part, Napier de l'autre, ne regardent comme positives que les réactions se produisant au plus tard en vingt minutes et s'accompagnant d'une opacification laiteuse plus ou moins apparente, surtout visible à la lumière réfléchie. Cette restriction donne une valeur diagnostique appréciable à la réaction. A la vérité, elle ne se produit pas avec tous les sérums de kala-azar, mais elle ne se rencontre qu'exceptionnellement sous cet aspect dans les autres maladies.

Pour plus de clarté nous allons étudier d'abord la gélification et ensuite la formol-opacification.

FORMOL-GÉLIFICATION. — Lloyd et Paul [63], d'après leurs expériences, arrivent à la conclusion que la formol-gélification est due aux euglobulines. Nous avons utilisé pour l'étude de cette question la technique que nous avons employée pour la réaction de Henry et la réaction à la résorcine ; c'est-à-dire qu'avec le sérum en expérience nous avons procédé à l'addi-

tion des diverses fractions protéiques extraites du sérum normal. Les expériences ont été faites avec le sérum de cheval.

Quand à un sérum de cheval, contenant normalement 36 grammes de globulines et 42 grammes de sérines par litre, on ajoute des euglobulines, la réaction varie de la façon suivante :

GÉLIFICATION

Sérum normal.	Nullé au bout de 24 heures.
Sérum normal + 2 gr. 5 d'euglobulines fraîches par litre.	Au bout de 18 heures.
Sérum normal + 5 grammes d'euglobulines fraîches par litre.	Au bout de 15 heures.
Sérum normal + 10 grammes d'euglobulines par litre.	Au bout de 6 heures.
Sérum normal + 15 grammes d'euglobulines par litre.	Au bout de 2 heures.
Sérum normal + 20 grammes d'euglobulines par litre.	Au bout de 10 minutes.

On ne constate qu'une très légère opalescence avec des doses d'euglobulines de 15 et 20 grammes.

Donc, on peut déduire des résultats ci-dessus que la formol-gélification dépend de la quantité des euglobulines totales, mais ces protéines n'interviennent que pour une part, à la vérité la plus grande.

LES PSEUDOGLOBULINES INTENSIFIENT LÉGÈREMENT LA RÉACTION.

Si, avant d'ajouter les euglobulines, nous enrichissons le sérum en pseudoglobulines à raison de 20 grammes par litre, nous constatons que la réaction croît plus rapidement en intensité :

GÉLIFICATION

Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines.	Complète en 4 heures.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 2 gr. 5 d'euglobulines.	En 10 heures.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 5 grammes d'euglobulines.	En 2 heures.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 10 grammes d'euglobulines.	En 20 minutes.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 15 grammes d'euglobulines.	En 5 minutes.
Sérum + 20 grammes de pseudoglobulines + 20 grammes d'euglobulines.	Presque instantanée.

Nous pouvons donc conclure que toutes les globulines agissent dans la réaction, mais que les euglobulines manifestent une action beaucoup plus énergique que les pseudoglobulines.

LE RÔLE DES SÉRINES CONTRAIRE LA GÉLIFICATION.

Nous avons pris le même sérum et, avant de l'additionner d'euglobulines, nous l'avons enrichi en sérines à raison de 20 grammes par litre. Ce sérum, avec 10 grammes d'euglobulines, reste liquide après addition de III gouttes de formol pendant plus de vingt-quatre heures. Ce n'est qu'avec 20 grammes d'euglobulines qu'une gélification légère commence à se manifester vingt-quatre heures après addition de formol.

On peut conclure de ces expériences que la formol-gélification révèle une augmentation des globulines, pseudo-globulines et surtout euglobulines et une diminution des sérines. Ce sont justement les proportions trouvées dans la leishmaniose à l'aide du dosage par Lloyd et Paul et d'autres. Mais on peut rencontrer des modifications de l'équilibre sérique analogues dans des sérums recueillis chez des patients atteints d'autres maladies. Plus la quantité d'euglobulines sera grande, et plus la diminution des sérines prononcée, plus la formol-gélification sera rapide.

FORMOL-OPACIFICATION. — Lloyd et Paul admettent un double mécanisme pour la formol-opacification. Si l'on peut amener une formol-gélification par addition d'euglobulines à des sérums normaux, il faut, pour produire l'opacification, que les euglobulines proviennent de sérums de kala-azar. Ils concluent de cette observation qu'il existe des euglobulines particulières dans le kala-azar. Nos expériences confirment entièrement ces résultats. Mais nous ne partageons pas l'interprétation des auteurs précités.

Le pH du mélange joue un rôle important; Chopra et Choudhury n'ont vu l'opacification se produire qu'en milieu alcalin [21].

Nous avons procédé au fractionnement des euglobulines, comme précédemment pour la réorocine, en traitant par des

solutions de NaCl à 2 et 4 p. 1.000 le précipité obtenu par dialyse contre l'eau distillée. Les trois fractions ainsi obtenues sont ajoutées à trois échantillons d'un sérum normal en proportion de 20 grammes environ par litre. Le sérum, enrichi avec les euglobulines les plus insolubles, gélifie en moins d'une heure avec opacification nette. Les deux autres sérums se solidifient sans présenter la teinte blanchâtre si caractéristique des sérums de kala-azar.

Si cette fraction des euglobulines insolubles est spécifique du kala azar, il n'en est pas moins vrai que pour la réussite de la réaction il faut aussi que l'ensemble des globulines augmente.

La conclusion qui se dégage de cette expérience, comme dans le sérum tuberculeux, est que les euglobulines ne sont pas des substances homogènes, qu'elles sont formées d'une mosaïque de fractions diverses et que les réactifs mettent en évidence telle ou telle d'entre elles.

Nous savons par ailleurs que la baisse des albumines est nécessaire pour que la formol-gélification produite par les euglobulines devienne possible. Il existe donc dans le kala-azar une diminution réelle des sérines en proportion très importante qu'on peut, d'après Lloyd et Paul, chiffrer à 20 à 30 grammes par litre.

Lloyd, Napier et Paul [64, 65], au cours de leurs recherches, ont vu que le traitement amène la décroissance très rapide de la quantité des euglobulines et que les pseudo-globulines au contraire augmentent. De telle sorte que l'inversion de formule sérines-globulines persiste malgré la diminution du chiffre des euglobulines.

Dans un cas de kala-azar que nous avons examiné en collaboration avec MM. R. Martin et G. Rouessé, on a trouvé, avant le traitement, 62 grammes de globulines totales et 25 grammes de sérines, en même temps qu'une réaction de formol-opacification très positive en trois à quatre minutes. Après huit mois de traitement, l'examen du sang relève 67 grammes de globulines et 25 grammes de sérines; mais la réaction de formol-opacification, lue au bout d'une heure, est devenue négative [69].

En conséquence, la formol-gélification révèle dans le sérum la diminution des sérines et l'augmentation des euglobulines,

la formol-opacification la prédominance d'une fraction des euglobulines insolubles dans une solution de NaCl à 4 p. 1.000.

SÉRUM DE KALA-AZAR ET FLOCCULATION DANS L'EAU DISTILLÉE.

Étant donné la quantité si considérable des euglobulines dans le sérum de kala-azar, on ne pouvait que s'attendre à le voir flocculer avec plus d'intensité que les autres dans l'eau distillée. Brahmachari [11 bis], en 1917, a remarqué qu'on obtient un trouble intense en ajoutant à de l'eau distillée quelques gouttes d'un tel sérum. Les résultats cliniques obtenus par cette méthode n'ont pas été concordants parce que la technique de la réaction n'était pas fixée. Milio [71] trouve cette épreuve très spécifique; Cerza [38], Castorina [46] lui attribuent une valeur de présomption. Navasso [74] ne lui reconnaît aucune valeur clinique. Caprara constate que la réaction se montre positive toujours dans la leishmaniose viscérale, mais rarement dans le paludisme, la syphilis et le typhus exanthématique [14].

Une technique plus rigoureuse permet d'utiliser cette propriété du sérum de kala-azar. Nous avons vu plus haut qu'il existe toute une échelle d'intensité dans la flocculation par l'eau distillée des sérums normaux, syphilitiques, paludéens et de kala-azar, et indiqué la nécessité de se servir d'un appareil optique tel que le photomètre de V. B. Y. Nous avons proposé pour cette réaction la technique que nous utilisons pour la réaction de Henry : l'examen des sérums frais, pris à jeun, dilués au 1/10 dans l'eau distillée. On observe alors une flocculation très rapide et très intense; souvent la première lecture est impossible par suite d'une trop grande opacité. D'autres fois la flocculation est moins intense, la première lecture, faite le plus rapidement possible, dépasse 200 et le plus souvent 250° au photomètre. Cette première lecture suffit déjà à différencier les sérums du kala-azar de ceux du paludisme et *a fortiori* de ceux de la syphilis.

Quand les lectures restent possibles, nous procédons de la façon suivante : le mélange est abandonné à la température du laboratoire (18-20°) pendant deux heures, en agitant fréquemment le mélange pour éviter l'adhérence du précipité aux parois du tube et pour désagréger les flocculats trop gros et

trop résistants qu'il deviendrait impossible à mettre en suspension homogène. En ce cas, il arriverait que la deuxième lecture donnât un chiffre plus faible que la première, ce qui suffit à juger de l'erreur commise. Cependant, quand on opère correctement, on écarte cet inconvénient et la différence entre la première et la deuxième lecture dépasse 100.

Ce qui caractérise les sérums de kala-azar, c'est la rapidité et l'intensité de la floculation.

Tous les auteurs reconnaissent que la réaction de Henry est très positive dans le kala-azar (Trensz, chez le chien; Henry, Chorine, etc., chez l'homme) ce qui ne doit pas surprendre, puisque la réaction de Henry ne mesure que l'instabilité du sérum dans l'eau distillée.

Auricchio et Chieffi [6] ont modifié légèrement la technique de Henry, en ajoutant, au lieu de mélanine formolée, du peptonate de fer. La valeur clinique de cette réaction a été confirmée par Giraud, Ciaudo et Bernard [48] et par Verde [97]. Le peptonate n'agit ni par le fer, ni par la peptone. C'est un produit acide qui, additionné au mélange sérique dans les proportions préconisées par les auteurs italiens, baisse le pH de 2 ou 3 décimales. Par ce seul fait, il intensifie la floculation [35].

Des résultats analogues peuvent être obtenus avec un acide minéral tel que HCl. Si cette réaction ne fournit aucun renseignement que ne puisse donner l'eau distillée employée seule, elle confère, par la précision des mesures macroscopiques, une valeur clinique supérieure à la simple lecture à l'œil nu de la floculation dans l'eau distillée. Les mesures les plus rigoureuses sont faites sans doute à l'aide du photomètre de V. B. Y. sur le sérum frais.

ACTION DU PHÉNOL SUR LES SÉRUMS DE KALA-AZAR.

Nous avons vu, à propos de la tuberculose, que les phénols agissent sur une fraction des euglobulines parmi les plus insolubles dans l'eau distillée. L'augmentation si intense des euglobulines dans le kala-azar devait commander la précipitation facile par les phénols.

Nous avons examiné les sérums de kala-azar par la méthode de Vernes à la résorcine qui est un métadiphénol. Tous les

sérums se sont montrés positifs à la résorcine. Les chiffres obtenus varient de 50 à 200.

Pour simplifier, nous avons utilisé l'acide phénique cristallisé. Le sérum à examiner est dilué dans l'eau physiologique à raison d'une partie de sérum pour 9 parties d'eau physiologique, et ensuite mélangé en parties égales avec des solutions de phénol de concentration différente. La lecture est faite au bout de dix minutes. Une opacification plus ou moins nette se produit, dont nous avons désigné l'intensité par des croix.

Phénol à 5 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	+++++
Sérum normal	++

Phénol à 4 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	+++++
Sérum normal	+

Phénol à 3 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	++++
Sérum normal	+—

Phénol à 2 p. 100 neutralisé avec NaOH :

Sérum de kala-azar.	++
Sérum normal	0

Le phénol a été amené au pH 7,3 pour éviter la légère acidité de la fonction phénolique.

Cette action du phénol n'est pas due à une baisse de concentration moléculaire du milieu, car avec des solutions neutres de phénol dans l'eau physiologique à 9 p. 1.000 les résultats sont les mêmes. L'addition de chlorure de sodium renforce l'action du phénol plutôt qu'il ne la diminue. Le phénol possède donc une action propre sur les sérums de kala-azar.

La dilution du sérum permet une différenciation plus nette entre les divers sérums pathologiques, car un sérum se trouble d'autant plus facilement qu'il est plus riche en fractions euglobuliniques précipitables par le phénol.

Nous avons vu que l'école de Vernes utilise la sensibilité au phénol du sérum tuberculeux. Dans l'échelle d'intensité de flocculation des sérums avec le phénol se trouvent d'abord les normaux, ensuite les sérums syphilitiques, puis certains sérums lépreux, tuberculeux, celui des anciens paludéens, des trypano-

somés, et finalement des malades atteints de leishmaniose viscérale.

Les autres phénols simples comme la phloroglucine produisent le même effet à une concentration de 2 à 3 p. 100. Par conséquent la fonction phénolique possède une action précipitante sur une partie des euglobulines contenue dans tous les sérums, et d'autant plus que la quantité en est plus forte.

ACTION DU TANIN. — Certains autres corps plus complexes possédant des fonctions phénoliques comme le tanin, exercent une action beaucoup plus énergique que les phénols simples. On sait que ce corps très acide précipite tous les sérums à concentration suffisante. Nous utilisons une solution de tanin à 2,5 p. 1.000, neutralisée extemporanément par $\text{Na OH } \frac{\text{N}}{10}$ à pH = 7,2. A 1 cent. cube de cette solution, on ajoute une goutte de sérum à examiner. Dans ces conditions les sérums de kala-azar flocculent presque instantanément avec beaucoup d'intensité. Les sérums paludéens et tuberculeux flocculent plus faiblement et les sérums normaux restent à peine troubles. Cette réaction présente beaucoup de ressemblance avec la réaction à l'uréastibanine de Chopra [18-20].

ROLE DE LA FONCTION ALCOOL. — En additionnant à 1 cent. cube de sérum dilué au 1/10 dans l'eau physiologique, 1 cent. cube d'alcool éthylique à 30°, on provoque un trouble très marqué des sérums de kala-azar. Les sérums normaux restent clairs. Les sérums plus riches en euglobulines flocculent avec une intensité intermédiaire entre les deux.

L'alcool méthylique donne des résultats identiques à des concentrations différentes.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

On voit donc que certains corps chimiques à fonctions phénol ou alcool précipitent tous les sérums à des concentrations élevées; lorsqu'on les utilise à doses plus faibles, ils ne troublent plus que les sérums riches en euglobulines, notamment ceux de kala-azar.

Parmi toute la série de corps proposés pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale, certains doivent agir uniquement par la fonction phénolique qu'ils possèdent, comme le sulfarsénol dans la réaction de Caminopetros [13, 47], le novarsénobenzol et même probablement l'uréastibamine dans la réaction de Chopra.

Il n'est donc pas étonnant que le nombre des réactions sérologiques croisse constamment pour le kala-azar, car on peut en trouver autant qu'il existe de phénols, soit simples, soit de structure plus complexe où la fonction phénolique se trouve sous une forme active. L'action des produits antimoniaux n'est sûrement pas due à la présence de l'antimoine tri- ou penta-valent, comme certains auteurs le supposent, mais à l'existence d'une fonction phénol ou alcool. Tous les sels d'antimoine que nous avons examinés ne manifestent aucun pouvoir diagnostique.

Nous diviserons les réactions sérologiques du kala-azar en trois catégories : 1° la formol-opacification, 2° les réactions basées sur la floculation dans l'eau distillée, et 3° les réactions sérologiques où certaines fonctions chimiques phénol ou alcool produisent une précipitation du sérum. Au point de vue clinique, il est utile de s'adresser à une réaction de chaque série pour avoir une réponse plus probante. Car ces réactions, comme toutes celles qui relèvent des euglobulines, ne sont que des réactions de probabilité dont la valeur croît avec le nombre des résultats positifs et des procédés employés pour les obtenir.

Comme illustration de ce que nous venons de dire, il convient de signaler l'observation de Giraud, P. Berthier, Ciaudo et Pralnaud [49] qui relèvent, dans un cas d'endocardite maligne, des réactions très positives à l'uréastibamine, au peptonate de fer, et par la formol-gélification.

La présence dûment constatée des parasites spécifiques permet seule de porter un diagnostic certain.

RELATION ENTRE LES DOSAGES ET LES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES.

Le dosage des protéines totales du sérum a quelques indications cliniques, surtout pour la néphrose lipoïdique où les protéines se trouvent nettement diminuées. Mais dans d'autres

maladies qui peuvent présenter une augmentation des protéines totales, comme la tuberculose, ce dosage devient de très faible secours.

Au fur et à mesure que nous entrons dans le détail, les résultats deviennent meilleurs. Déjà, le dosage des globulines totales peut être plus utilement employé pour guider le diagnostic dans la cirrhose du foie ou le kala-azar. Mais il convient d'ajouter que la fraction globulinique se trouve augmentée dans la plupart des maladies infectieuses.

Si l'on mesure la quantité des euglobulines, on fait un nouveau progrès. Malheureusement, nous sommes arrêtés par le manque de précision dans la définition des euglobulines. Qu'on désigne sous ce nom les protéines insolubles dans l'eau distillée, la quantité n'en peut être mesurée sans erreur parce qu'elle varie avec le pH, la dilution, la proportion des albumines, etc.

Il en est de même de celles qui sont obtenues par précipitation saline, sulfate de soude (Howe) ou sulfate d'ammonium (Porges). Il est facile de se rendre compte qu'après une précipitation par le sulfate de soude à 14 p. 100, le sérum contient encore des substances insolubles dans l'eau distillée. Cependant, malgré leur imperfection, ces méthodes ont permis à Lloyd et Paul d'affirmer avec justesse que presque 50 p. 100 des protéines totales dans un sérum de kala-azar sont constituées par les euglobulines.

Trensz a vérifié après ces deux auteurs que le sérum paludéen est plus riche en euglobulines que le sérum normal. Mais les dosages qu'il a faits avec M^{lle} Jardon lui ont montré que si la quantité des euglobulines augmente au cours du paludisme, il existe des sérums normaux, négatifs à la mélanine, encore plus riches en euglobulines que les sérums positifs.

Il faut en arriver à rechercher dans les euglobulines cette fraction dont nous avons fait ressortir la spécificité pour chaque maladie.

Conclusions.

1° La réaction de Henry n'est pas due à la présence d'anticorps dans le sérum des paludéens parce que :

a) La mélanine ne possède de propriété antigène que pour les organismes normalement dépourvus de ce pigment ;

b) La mélanofloculation commence à se manifester chez les paralytiques généraux trois à sept jours après l'impaludation. Les anticorps demanderaient beaucoup plus de temps à se former ;

c) L'intensité de la réaction varie d'un jour à l'autre pour un même sérum conservé à la glacière. Ces variations seraient inexplicables si c'étaient des anticorps qui intervenaient dans la réaction ;

d) La réaction ne se produit que dans l'eau distillée ou les solutions hypotoniques. Les anticorps agissent dans les solutions isotoniques et même légèrement hypertoniques.

2° La floculation du sérum dans l'eau distillée suit fidèlement la mélanofloculation ;

3° La réaction de Henry se résume à la floculation du sérum dans l'eau distillée ou les solutions hypotoniques, la mélanine n'intervenant que pour en intensifier la perception ;

4° L'action de la mélanine devient celle d'un indicateur qui rend visible un phénomène inapparent. En tant qu'indicateur, elle peut être remplacée par plusieurs autres substances telles que carmin, corps microbiens, etc. ;

5° On peut provoquer la floculation de certaines fractions protéiniques du sérum en employant, au lieu d'eau distillée, divers agents chimiques ou physiques comme les acides et les phénols, et en intensifier la visibilité par addition de mélanine ou autres indicateurs. Cependant, aucune de ces réactions ne peut être identifiée avec la réaction de Henry.

6° Le mécanisme chimique de la réaction est très complexe. On peut grossièrement le résumer en quelques propositions :

a) La floculation est due à l'augmentation des euglobulines et des complexes lipoïdiques précipitables par l'eau distillée ;

b) L'élévation de la quantité des sérines paralyse la réaction ;

c) Les pseudoglobulines n'exercent qu'une faible action ; additionnées à un sérum positif, elles diminuent légèrement l'intensité de la réaction ;

d) Quand la concentration moléculaire du sérum en électrolytes augmente, l'intensité de la réaction baisse et inversement, parce que les euglobulines qui interviennent pour une

grande part dans la réaction sont solubles en présence de sels minéraux. Les solutions non ionisées n'exercent aucune action sur la solubilité des euglobulines qui précipitent dans une solution de sucre isotonique, comme dans l'eau distillée.

7° Le chauffage du sérum à 55° pendant une demi-heure abolit la réaction à la mélanine et rend le sérum plus stable vis-à-vis de l'eau distillée. Cette action est due à l'alcalinisation du sérum par départ de CO² dissous normalement dans le sérum à température plus basse.

8° Au point de vue clinique, il revient au même de mesurer la floculation du sérum au 1/10 dans l'eau distillée pure ou au 1/5 dans l'eau distillée additionnée d'indicateurs.

9° Il existe une concordance parfaite entre les données cliniques et l'évolution de la réaction. La réaction chez les paralytiques généraux devient positive du troisième au cinquième jour après l'injection du sang palustre. Elle croît en intensité jusqu'au sixième ou septième accès, où elle atteint son maximum.

10° Le traitement laisse la réaction stationnaire pendant une dizaine de jours et en amène la décroissance progressive ensuite. En cas de guérison, la réaction devient négative trente à soixante-dix jours après le commencement du traitement quinqué. La quinacrine paraît agir plus vite.

11° La valeur clinique de la réaction est indéniable. Une réaction négative, en dehors de l'accès fébrile, indique l'absence de paludisme ; une réaction positive n'est qu'un signe de probabilité.

12° La réaction de la résorcine révèle un déséquilibre protéinique portant aussi sur les euglobulines :

a) Elle n'est pas influencée par l'addition à un sérum négatif de pseudoglobulines en proportion même très élevée ;

b) Les sérums inhibent la floculation d'un sérum tuberculeux ;

c) C'est une petite fraction seulement des euglobulines qui se montre active.

13° Dans le sérum de kala-azar particulièrement riche en euglobulines toutes les réactions sérologiques dues à ces protéines se montrent positives.

14° La formol-gélification dénonce l'augmentation des euglo-

bulines, la diminution des sérines et, secondairement, l'élévation de la quantité des pseudoglobulines.

15° La formol-opacification de Napier est commandée par une toute petite fraction des euglobulines. Les euglobulines totales extraites du sérum normal sont presque sans action.

16° Le sérum de kala-azar est instable dans l'eau distillée. Cette propriété, découverte par Brahmachari, a fourni dans la pratique les résultats les plus discordants en l'absence de technique précise. L'emploi du photomètre de Vernes apporte dans la mesure la précision qui manquait.

17° La réaction de Auricchio et Chieffi n'ajoute à l'eau distillée que le peptonate de fer qui, en abaissant le pH de 2 ou 3 décimales, provoque une plus abondante floculation.

18° Les alcools éthylique et méthylique précipitent les sérums de kala-azar à une concentration moindre que celle qu'il faut utiliser pour obtenir le même résultat avec les sérums normaux.

19° Les sérums de kala-azar sont plus sensibles à l'action du phénol que les sérums normaux.

20° La réaction de Caminopetros est due au groupement phénolique contenu dans le sulfarsénol ; il en est de même du novarsénobenzol.

21° Dans les réactions de Chopra ou de Nattan-Larrier, ce n'est nullement l'antimoine trivalent ou pentavalent contenu dans les corps employés qui réagit, mais très probablement des groupements chimiques simples tels que l'alcool ou le phénol.

22° Dans les diverses maladies où la réaction est fondée sur une augmentation de la quantité des euglobulines, il faut entendre que ce n'est qu'une partie des euglobulines normales qui seule s'accroît.

23° Les euglobulines du sérum ne représentent pas une substance homogène, on peut en séparer de nombreuses fractions partielles à fonctions différentes reposant probablement pour chacune sur la présence de divers complexes lipoprotéiniques.

24° Au cours de diverses maladies, une de ces fractions commence à prédominer et détermine la réaction caractéristique de l'infection. Quand l'augmentation des euglobulines devient trop intense, plusieurs fractions entrent en jeu à la fois

et renversent la barrière de la spécificité. Toutes les réactions commandées par les euglobulines jusqu'alors employées se montrent positives. Nous en avons un exemple dans le sérum de kala-azar.

25° Il est évident que les euglobulines totales qu'on extrait du sérum tuberculeux ne sont pas identiques à celles qu'on retire du sérum paludéen ou du kala-azar; les euglobulines pathologiques diffèrent des euglobulines du sérum normal. Les fractions caractéristiques à chaque maladie préexistent dans le sérum normal, mais en proportion différente de celle qu'on trouve dans les sérums pathologiques.

26° Les méthodes chimiques de dosage que nous possédons ne nous permettent pas jusqu'alors de préciser la proportion des diverses fractions actives contenues dans un sérum. Il ne faut donc pas nous étonner que nous ne puissions prévoir comment ce sérum va se comporter en présence de tel ou tel réactif.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ACHARD (Ch.), BARIÉTY (M.) et CODOUNIS (A.). *Bull. Acad. de Méd.*, **52**, 1929, p. 153.
- [2] ADANT (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 241.
- [3] ADIDA (P.). *Gaz. des Hôp.*, **102**, 1929, p. 1137; et **103**, 1930, p. 475.
- [4] ALCAY (L.), CATTOIR (E.) et MARILL (F. G.). *Paris méd.*, 1933, p. 516.
- [5] ANDRIADZE. *Nach. der Trop. Med.*, Tiflis, **2**, 1929, p. 2.
- [6] AURICCHIO (L.) et CHIEFFI (A.). *Pediatrics*, **43**, 1935, p. 745.
- [7] BENHAMOU et GILLE. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1573.
- [8] BIASIOTTI (M.). *Il Policlinico*, 1933.
- [9] BONALBERTI (E.). *Boll. Ist. Sieroter. Mil.*, Milano, 1931.
- [10] BONNET (A.). *C. R. du II^e Congr. intern. du Paludisme*. Alger, **1**, 1930, p. 773.
- [11] BORDET (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1256.
- [11 bis] BRAHMACHARI (U. N.). *Ind. Med. Gaz.*, **52**, 1917, p. 319 et 429.
- [12] BROTZU (G.). *Soc. Intern. de Microbiol.*, *Bull. d. Sez. Ital.*, **3**, 1911, p. 429.
- [13] CAMINOPETROS (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 910.
- [14] CAPRARA. *Cultura Medica Moderna*, A. V., n° 30, 1926.
- [15] CARTANA CASIELLA (P.). *C. R. du II^e Congr. Intern. du Paludisme*, Alger, **1**, 1930, p. 789, et *Medic. de Los Países Calidos*, 1931.
- [16] CASTORINA. *Cité d'après Caprara*.
- [17] CHABRELIE (L.). *La séroflocculation du paludisme*. Thèse, Lyon 1928.
- [18] CHOPRA (R. N.). *Ind. Med. Gaz.*, **61**, 1926, p. 162, et *Ind. Journ. Med. Res.*, **15**, 1927, p. 41.
- [19] CHOPRA (R. N.), GUPTA (I. C.), BASU (N. K.) et DAVID (J. C.). *Ind. Med. Gaz.*, **62**, 1927, p. 325.
- [20] CHOPRA (R. N.), GUPTA (I. C.) et BASU (N. K.). *Ind. Med. Gaz.*, **62**, 1927, p. 434 et 68°.

- [24] CHOPRA (R. N.) et CHOUDHURY (S. G.). *Journ. of Med. Research.*, **16**, 1928-1929, p. 925.
- [22] CHORINE (V.). *Rivista di Mariologia*, **11**, n° 3, 1933.
- [23] CHORINE (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 1164.
- [24] CHORINE (V.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1933, p. 269.
- [25] CHORINE et GILLIER, *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 1419; *C. R. Acad. des Sc.*, 1933, p. 950; ces *Annales*, **52**, 1932, p. 1419.
- [26] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 290.
- [27] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.) et KOECHLIN (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 1255.
- [28] CHORINE (V.) et RODIEUX (M.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1933, p. 1249.
- [29] CHORINE (V.) et KOECHLIN (D.). *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 19.
- [30] CHORINE (V.) et KOECHLIN (D.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **28**, 1933, p. 375.
- [31] CHORINE (V.). *Rivista di Malarologia*, année 13, Sezione I, n° 6.
- [32] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.). *Bull. Acad. de Méd.*, **111**, n° 10, 1934.
- [33] CHORINE (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1323.
- [34] CHORINE (V.). *Rev. colon. de Méd. et de Chir.*, n° du 15 octobre 1935.
- [35] CHORINE (V.) et PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, 1936, p. 831.
- [36] CHORINE (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **21**, 1936, p. 297.
- [37] CHWATT (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **116**, 1934, p. 707.
- [38] CERZA (L.). *Pediatrics*, **38**, 1930, p. 394.
- [39] CORRADETTI (A.). *Riv. di Malariol.*, **2**, 1932, p. 283.
- [40] DHONT (C.). *Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.*, **78**, p. 2188.
- [41] FARJOT. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1933, p. 428.
- [42] FOX (E. C. R.) et MACKIE (F. P.). *Amer. Journ. of Hyg. Monograph.*, séries n° 3, 1921, p. 229.
- [43] FABREGOULE (M.). *De la séroflocculation à la mélanine au cours du paludisme*, Thèse, Alger, 1936.
- [44] FIORENTINO (A.). *Pediatrics*, **38**, 1930, p. 137.
- [45] GATE (J.) et PAPACOSTAS. *C. R. Soc. de Biol.*, **83**, 1920, p. 1432; **85**, 1921, p. 1029.
- [46] GILLE (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 334.
- [47] GIRAUD (P.) et CIAUDO. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **28**, p. 379.
- [48] GIRAUD, CIAUDO et BERNARD. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **28**, 1933, p. 811.
- [49] GIRAUD (P.), BERTHIER, CIAUDO et PRALIAUD. *Bull. et Mém. Soc. méd. de Paris*, **51**, 3^e série, 1935, p. 863.
- [50] GRIEG (E.), v. ROOYEN (C.) et HENDRY (E.). *Lancet*, **1**, 1934, p. 1393, *Journ. of Trop. Med. and Hyg.*, **37**, 1934, p. 193 et 289; *Trans. Royal Soc. Trop. Med. a Hyg.*, **28**, 1934, p. 175.
- [51] HENRY (A. F. X.). *Congr. de l'Assoc. franç. p. l'Avanc. des Sc.*, Constantine, **52**, 1927; *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 1928, p. 819; **100**, 1929, p. 671; **101**, p. 259, 261 et 1026; **107**, 1931, p. 1520; **112**, 1933, p. 785. *Congr. de l'Assoc. franç. p. l'Avanc. des Sc.*, La Rochelle, **52**, 1928; *Paris médical*, 1930, p. 496; *C. R. du II^e Congrès intern. du Paludisme*, Alger, **1**, 1930, p. 750; *Arch. Inst. Prophyl.*, **1**, 1929, p. 341; *Bull. Soc. Path. Exot.*, **26**, 1934, p. 914.
- [52] KAPPUS (A.). *Archiv. f. Schiffs- und Tropen Hyg.*, **36**, 1932, p. 576.
- [53] KAROUT (T.) et MODALVSKAYA KMITCHEVSKAYA (V.). *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933.
- [54] KRITCHEVSKY (I. L.) et RUBINSTEIN (P. L.). *Zeit. f. Immunitätsf.*, **84**, 1935, p. 397.
- [55] LAVERGNE (J.) et MONIER (H.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **24**, 1931, p. 539.

- [56] LE BOURDELLÈS (B.). *Lyon médic.*, 1928, p. 432; *C. R. Soc. Biol.*, 1928, p. 1349; *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 59, 1933, p. 744.
- [57] LE BOURDELLÈS et FRIBOURG-BLANC (A.). *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 59, 1935, p. 1013.
- [58] LE BOURDELLÈS (B.) et LIÉGEOIS (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, 98, 1928, p. 1342; 191. 1929, p. 466 et 1148; *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 53, 1924, p. 1198.
- [59] LE BOURDELLÈS (B.), LIÉGEOIS et CHABRELIE (L.). *Arch. de Méd. et de Pharm. militaires*, 92, 1930, p. 179.
- [60] LE BOURDELLÈS (B.) et VELLUZ (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, 108, 1931, p. 402.
- [61] LIVIERATO, VAGLIANO et CONSTAKATO. *C. R. Soc. de Biol.*, 110, 1932, p. 26.
- [62] LIVIERATO (S.) et SALATA (C.). *Acta med. Scandinavica*, 87, 1935, p. 189.
- [63] LLOYD (R. B.) et PAUL (S. N.). *Ind. Journ. of Med. Research.*, 16, 1928-1929, p. 203.
- [64] LLOYD (R. B.) et PAUL (S. N.). *Ind. Journ. of Med. Research.*, 16, 1928-1929, p. 529.
- [65] LLOYD (R. B.), NAPIER (L. E.) et PAUL (S. N.). *Ind. Journ. of Med. Research.*, 16, 1928-1929, p. 1066.
- [66] LLOYD (R. B.) a. PAUL (S. N.). *Ind. Journ. Med. Res.*, 17, 1929, p. 583.
- [67] MACHEBOEUF (M.). *Thèse de Doctorat ès Sc.*, Paris, 1928. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 24, 1929, p. 270.
- [68] MARCHOUX (E.) et CHORINE (V.). *Presse Médicale*, n° 101 du 18 décembre 1935.
- [69] MARTIN (R.), CHORINE (V.) et ROUÉSSE [G.]. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 28, 1935, p. 382.
- [70] MEERSSEMANN (F.) et LACOUR (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, 112, 1933, p. 908.
- [71] MILIO. *Cité d'après Caprara*.
- [72] NANNI (C.). *Giorn. Med. milit.*, 80, 1931, p. 381.
- [73] NAPIER (L. E.). *Ind. Med. Gaz.*, 56, 1921, p. 338; 58, 1923, p. 104; 59, 1924, p. 492. *Ind. Journ. Med. Res.*, 9, 1922, p. 830; 11, 1924, p. 719.
- [74] NOVASSO (J.). *Pediatrics*, 31, n° 5, 1923.
- [75] NATTAN-LARRIER et GRIMARD-RICHARD (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, 116, 1934, p. 492.
- [76] NINNI et de BLASI. *Pathologica*, 30, 1930, p. 233.
- [77] PANDY. *Neurol. Zentralblatt*, 1910, p. 915.
- [78] PINELLI (L.). *Riv. di Malarial.*, 8, 1929, p. 310.
- [79] POZZI (A.). *Il Policlinico, sez. med.*, 1930, p. 361.
- [80] PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, 119, 1935, p. 1115.
- [81] PRUDHOMME (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, 120, 1935, p. 944.
- [82] RODILLON (G.). *Bull. Biol. Pharm.*, 1929, p. 207.
- [83] SABATUCCI (M.). *Riv. di malarial.*, 1928, p. 853.
- [84] SJOERENSEN (S. P.). *C. R. du Labor. Carlsberg*, 18, n° 5, 1930.
- [85] SPACKMAN (W. C.). *Brit. Med. Journ.*, 2, 1921, p. 266.
- [86] THEOBALT (M.). *Soc. Med. des Hôp. de Paris*, 1933, p. 752.
- [87] TESTONI (P.). *Archivio di Fisiologia*, 24, 1926, p. 192.
- [88] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 25, 1932, p. 230.
- [89] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 25, 1932, p. 314; et *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 15, 1932, p. 443.
- [90] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 27, 1934, p. 333.
- [91] TRENSZ (F.). *Ces Annales*, 55, 1935, p. 208.
- [92] TRENSZ (F.). *C. R. Soc. de Biol.*, 119, 1935, p. 966.
- [93] TRENSZ (F.). *Arch. de l'Inst. Pasteur d'Algérie*, 13, 1935, p. 513.
- [94] TRENSZ (F.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 28, 1935, p. 558.

- [95] TZEKNOVITZER (M.), MODALYSKAYA-KRITCHEVSKAYA (V.) et GORCHOWA (E.) et FREIDMANN (G.). *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 1093.
- [96] TZEKNOVITZER (M.), MODAVSKAYA-KRITCHEVSKAYA (V.) et GORCHOWA (E.). *Zentralblatt. f. Bakt.*, **36**, orig. 1932, p. 419.
- [97] VERDE (M.). *Pediatrics*, **43**, 1935, p. 894.
- [98] VERNES (A.), BRICQ et GAGER (A.). *Travaux et publications de l'Inst. prophyl.*, f. 4, 1926.
- [99] VIALATTE (Ch.) et REMOTET (E.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **23**, 1930, p. 590
- [99 bis] VILLAIN (H.) et DUPOUX (R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, **28**, 1935, p. 915.
- [100] VLÈS et de COULON. *Arch. de Phys. biol.*, **5**, 1926, p. 161.
- [101] VOIGTLANDER (W.). *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. Experim. Therap.*, 1934.
- [102] WISEMAN (H.). *Lancet*, 2, 1934, p. 543.

Le Gérant : G. MASSON.